

Paramètres opérationnels favorisant le développement d'un
biofilm nitrifiant au sein d'un procédé par biomasse fixée :
évaluation par qPCR, amorces dégénérées et paramètres
intégrateurs en eaux usées

par

François-René BOURGEOIS

THÈSE PAR ARTICLES PRÉSENTÉE À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE
SUPÉRIEURE COMME EXIGENCE PARTIELLE À L'OBTENTION
DU DOCTORAT EN GÉNIE
Ph. D.

MONTRÉAL, LE 26 OCTOBRE 2018

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC



François-René Bourgeois, 2018



Cette licence [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de mentionner l'auteur, que ces utilisations soient faites à des fins non commerciales et que le contenu de l'œuvre n'ait pas été modifié.

PRÉSENTATION DU JURY
CETTE THÈSE A ÉTÉ ÉVALUÉE
PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

M. Frédéric Monette, directeur de thèse
Département de génie de la construction à l'École de technologie supérieure

Mme Lyne Woodward, présidente du jury
Département de génie électrique à l'École de technologie supérieure

M. Robert Hausler, membre du jury
Département de génie de la construction à l'École de technologie supérieure

M. Mathias Glaus, membre du jury
Département de génie de la construction à l'École de technologie supérieure

M. Yann Lebihan, examinateur externe
Centre de recherche industriel du Québec-CRIQ

ELLE A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 30 AOÛT 2018

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

*Pour mes enfants,
puissiez-vous toujours
vous émerveiller des choses de la vie
et alimenter votre curiosité*

AVANT-PROPOS

*"Même si la vie semble difficile,
il y a toujours quelque chose que
vous pouvez faire et réussir."*

Stephen Hawking (1942-2018)

Cette thèse est le fruit de beaucoup d'efforts et de sacrifices. Elle s'est peut-être éternisée bien au-delà de mes attentes, mais tous ces efforts n'auront pas été vains. La route fut tortueuse, mais très formatrice et je peux dire que j'en suis fier. Tout au long de ces années, cette thèse a toujours été au centre de mes pensées, de mes préoccupations. Cela fait tellement longtemps qu'elle m'accompagne que mes enfants ne m'avaient jamais vu sans cette constante préoccupation qui m'habitait. Cependant, cette thèse ne me définit pas et doit maintenant rejoindre ces consœurs contribuant à la connaissance scientifique. Au bout de ce long voyage, c'est avec un étrange sentiment que j'ai l'impression de quitter une vieille amie à la croisée des chemins, moment touchant, mais nécessaire, où l'on doit tourner la page pour continuer d'avancer. J'espère que vous apprécierez le fruit de ce parcours et que celui-ci serve d'inspiration pour tous ceux et celles qui veulent persévérer.

REMERCIEMENTS

Beaucoup de personnes ont contribué au succès de cette thèse et j'espère être en mesure de tous les remercier. Si votre nom n'apparaît pas, sachez que je ne vous oublie pas pour autant et que je tiens à souligner votre contribution, par vos paroles ou vos actes, à l'accomplissement de ce projet. Merci! Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Frédéric Monette, d'avoir cru en moi et de m'avoir supporté malgré mes nombreuses inquiétudes. Merci à Mario Gagné d'avoir accepté le projet et de m'avoir donné accès à la station d'épuration de Ville de Laval. Sans vous, rien de tout ceci n'aurait été possible. Je remercie également les opérateurs de la station pour m'avoir si bien accueilli dans votre équipe, pour toutes ces discussions constructives concernant le procédé et pour votre professionnalisme. Merci particulièrement à Steve Dubé et Jacques Carbonneau, une part de tout ce travail vous revient.

Je tiens également à remercier la précieuse collaboration de Daniel Cyr et de son équipe à l'INRS-IAF. Merci à Julie Dufresnes pour les bons moments passés au laboratoire et pour les conseils techniques. Merci à tous ceux et celles qui ont croisé ma route, étudiants et enseignants, qui ont démontré de l'intérêt pour mon projet, mais surtout pour vos encouragements à me voir un jour terminé. Ça y est Loredan, depuis le temps qu'on en parle, nous y sommes enfin! Merci à mes parents de m'avoir accueilli chez vous pour me permettre de rédiger alors que j'avais besoin d'être complètement isolé. Merci aux amis d'avoir été discret sur ce sujet lorsque j'avais simplement besoin de me changer les idées.

Pour terminer, je ne pouvais pas passer à côté des personnes les plus importantes de ma vie et qui ont très certainement le plus souffert de ce projet. Nathalie, sache que je suis conscient de tous les sacrifices que tu as faits, certainement plus importants que les miens, pour me voir réussir. Je t'aime et je te remercie de faire partie de ma vie. À mes enfants, Mathis, Léo, Emery et Anaève, vous serez à jamais la plus belle réalisation de toute ma vie.

PARAMÈTRES OPÉRATIONNELS FAVORISANT LE DÉVELOPPEMENT D'UN BIOFILM NITRIFIANT AU SEIN D'UN PROCÉDÉ PAR BIOMASSE FIXÉE : ÉVALUATION PAR qPCR ET AMORCES DÉGÉNÉRÉES ET PARAMÈTRES INTÉGRATEURS EN EAUX USÉES

François-René BOURGEOIS

RÉSUMÉ

Dans l'optique de répondre à la réglementation canadienne ou aux exigences québécoises sur les rejets d'azote ammoniacal et de la toxicité à l'effluent, une approche opérationnelle favorisant le développement d'un biofilm nitrifiant est proposée. Cette approche, peu coûteuse, permettrait aux stations d'épuration de type biofiltration une mise à niveau uniquement fondée sur une base opérationnelle plutôt que sur une réfection complète du procédé en place. Ces paramètres opérationnels visés sont l'aération, le lavage à contre-courant ainsi que la régulation du débit. Les études existantes ne permettent pas à ce jour d'évaluer si ces paramètres peuvent favoriser le développement d'une flore nitrifiante dans un procédé qui n'est pas originalement conçu pour soutenir la nitrification. De plus, les études existantes ne démontrent pas le lien entre la flore bactérienne et le rendement épuratoire dans le cas d'une biomasse fixée.

L'objectif général de la présente thèse consiste à définir le lien qui existe entre l'état des populations relatives des bactéries nitrifiantes dans un biofilm de type « biomasse fixée » provenant d'un filtre biologique aéré, les caractéristiques d'eaux usées, les conditions opérationnelles ainsi que la capacité de traitement de la matière organique ou de l'azote ammoniacal. Lors de différentes campagnes expérimentales menées en station d'épuration, des échantillons de média filtrant et d'eaux usées ont été prélevés à différentes profondeurs d'un biofiltre existant (0,3; 0,6; 1,2 et 1,5 m) afin de caractériser l'état du biofilm ainsi que le rendement épuratoire tout au long du passage de l'eau dans le filtre biologique, et ce, en fonction des paramètres opérationnels étudiés. Les échantillons de biofilm ont été étudiés par une approche originale utilisant la qPCR avec amorces dégénérées pour l'estimation de la présence relative des principales bactéries responsables de la nitrification : les bactéries oxydant l'ammonium (AOB) et les bactéries oxydants les nitrites (NOB). Ces nouveaux marqueurs moléculaires ont été conçus sur la base des séquences génétiques partielles des gènes *amoA* (sous unité alpha de l'enzyme « ammonium monooxygénase ») et *nxrB* (sous unité bêta de l'enzyme « nitrite oxydoréductase »). Une caractérisation tridimensionnelle du biofilm par analyse FISH et par imagerie confocale a également été réalisée afin de confirmer la tendance observée par les résultats qPCR. Les paramètres de CDBO₅, de DCO, d'azote total et ammoniacal, de nitrate, d'alcalinité et de sulfures ont été analysés sur les échantillons d'eaux usées prélevés afin d'estimer le rendement épuratoire aux différentes profondeurs des cellules de traitement ainsi que pour confirmer la présence de nitrification.

Les résultats portant sur les effets des paramètres opérationnels ont démontré une augmentation de la population relative des AOB et NOB par rapport à la population bactérienne (article scientifique 1). La présence relative dans les cellules tests avec les

amorce *amoA* et *nxrB* ont été évalués à 0,50 % et 0,033 % respectivement lors des essais opérationnels d'aération, à 0,21 % et 0,046 % lors des essais de modification des lavages et 0,58 % et 6,3 % lors des essais sur le débit d'eaux usées dirigé sur les cellules de traitement. Les analyses FISH ont démontré qu'il ne semble pas y avoir de colocation obligatoire entre les AOB et NOB soulevant ainsi l'hypothèse que les NOB ne sont pas totalement dépendantes des AOB pour leur croissance.

Le développement de la population relative de AOB et NOB a également été observé lorsque considéré par rapport à l'ensemble du biofilm (article scientifique 2). Les résultats des paramètres d'analyses des eaux ont mis en évidence l'amélioration significative du traitement de la charge carbonée tout en confirmant la présence de nitrification. Le plus haut taux d'enlèvement d'azote ammoniacal observé a été de 49 % lors des essais de modification des lavages des filtres contre 16 % pour le contrôle. La population nitrifiante au sein de tout le biofilm a été évaluée à 0,032 % et 0,008 % pour les AOB et NOB respectivement contre 0,019 % et 0,004 % respectivement pour la cellule test. Les plus fortes valeurs observées de AOB et NOB proviennent des essais sur le débit avec des valeurs respectives de 0,034 % et 0,18 %. Cependant, la nitrification observée lors de ces essais a été évaluée à 21 % d'enlèvement. La consommation énergétique supplémentaire, évaluée en kWh par kilogramme de DBO₅ et NH₄⁺ enlevés par jour pour l'enlèvement de la charge carbonée et azotée de la cellule test par rapport à la cellule de contrôle, a été évaluée à 407 kWh/kg/d lors des essais de condition d'aération, à 69 kWh/kg/d lors des essais de paramètre modifié de lavage et 152 kWh/kg/d lors des essais d'ajustement du débit (article scientifique 3). Il apparaît que l'oxygène dissous est le paramètre clé pour assurer un bon rendement de nitrification, et ce, en dépit de la population bactérienne nitrifiante présente. Ainsi, l'oxygène dissous devrait être maintenu à au moins 6 mg-O₂/L dans le cas des biomasses fixées, et en profondeur s'il y a usage d'un lit biofiltrant.

Finalement, il est possible, par l'action de quelques changements opérationnels, de favoriser le développement d'une flore bactérienne nitrifiante dans un procédé qui n'est pas originalement conçu à cet effet. L'aération, les lavages à contre-courant et le débit ont tous une incidence positive sur le développement des AOB et NOB. Toutefois, pour assurer la nitrification, le maintien d'une aération à 6 mg-O₂/L et les lavages moins intenses semblent s'avérer des solutions prometteuses. L'augmentation du temps de résidence hydraulique n'a pas amélioré la nitrification, mais elle a permis d'augmenter la concentration en oxygène dissous dans le liquide interstitiel. Ce paramètre favorise la diffusion de l'oxygène dissous et diminue ainsi la demande énergétique associée. Ces résultats constituent une avancée dans la compréhension du comportement des biofilms de type biomasse fixée dans le domaine de l'épuration municipale et les principales conclusions peuvent être aisément appliquées à tous les procédés de ce type, élargissant ainsi leur potentiel de traitement épuratoire.

Mots clés : biofiltration, biofilm à biomasse fixée, AOB et NOB, nitrification, paramètres opérationnels.

OPERATIONAL PARAMETERS PROMOTING THE DEVELOPMENT OF A NITRIFYING BIOFILM WITHIN A FIXED BIOMASS PROCESS: qPCR ASSESSMENT WITH DEGENERATED PRIMERS AND WASTE WATER TREATMENT EFFICIENCY

François-René BOURGEOIS

ABSTRACT

In order to meet Canadian regulations or Quebec requirements for ammonia nitrogen discharges and effluent toxicity, an operational approach favoring the development of a nitrifying biofilm is proposed. This low-cost approach would allow biofiltration-type treatment plants to upgrade only on an operational basis rather than on a complete upgrade of the existing process. These parameters are aeration, backwashing and flow control. Existing studies have not yet been able to evaluate whether these parameters can promote the development of nitrifying flora in a process that is not originally designed to support nitrification. In addition, existing studies do not demonstrate the link between bacterial flora and treatment performance in the case of fixed biomass.

The general objective of this thesis is to define the link between the state of the relative populations of nitrifying bacteria in a "fixed biomass" type biofilm from an aerated biological filter, the characteristics of wastewater, the operating conditions and the treatment capacity of organic matter or ammonia nitrogen. During different experimental campaigns in the treatment plant, samples of filter medium and wastewater were taken at different depths of an existing biofilter (0.3, 0.6, 1.2 and 1.5 m). to characterize the state of the biofilm as well as the purification performance throughout the passage of water in the biological filter, and this, according to the operational parameters studied. Biofilm samples were studied using an original approach using qPCR with degenerate primers to estimate the relative presence of the main bacteria responsible for nitrification: ammonium oxidizing bacteria (AOB) and nitrites oxidizing bacteria (NOB). These new molecular markers were designed on the basis of the partial genetic sequences of the *amoA* genes (alpha subunit of the enzyme "ammonium monooxygenase") and *nxrB* (subunit beta of the enzyme "nitrite oxidoreductase"). A three-dimensional characterization of the biofilm by FISH analysis and confocal imaging was also performed to confirm the trend observed by the qPCR results. The integrating parameters of CBOD₅, COD, total and ammonia nitrogen, nitrate, alkalinity and sulphides were analyzed on the wastewater samples taken to estimate the treatment efficiency at the different depths of the treatment cell and to confirm the presence of nitrification.

The results on the effects of the operational parameters showed an increase in the relative population of AOB and NOB compared to the bacterial population (Article 1). The relative presence in the test cells, with the primers *amoA* and *nxrB*, were evaluated at 0.50 % and 0.033 % respectively during the aeration tests, at 0.21 % and 0.046 % during the backwashes modification tests and 0.58 % and 6.3 % in the wastewater inflow tests. FISH analyzes have shown that there does not appear to be any mandatory colocation between AOB and NOB, thus raising the assumption that NOB are not totally dependent on AOB for their growth.

The development of the relative population of AOB and NOB was also observed when considered in relation to the entire biofilm (Article 2). The results of the integrating parameters of water analyses revealed significant improvement in the treatment of the carbon load. The highest rate of ammonia nitrogen removal observed was 49 % in the test cell during the modified backwash parameter assay, while the relative nitrifying population within the entire biofilm was evaluated at 0.032 % and 0.008 % for the AOB and NOB respectively. The highest observed values of AOB and NOB come from the inflow tests with values of 0.034 % and 0.18 % respectively. However, observed nitrification was evaluated at 21 % of ammonia removal. The additional energy consumption for the removal of carbon and nitrogen load from the test cell compared to the control cell was evaluated at 407 kWh/kg·d⁻¹ during the aeration condition test, at 69 kWh/kg/d during the modified backwash parameter assay and 152 kWh/kg/d during the inflow adjustment test (Article 3). It appears that dissolved oxygen is the key parameter to ensure a good nitrification performance, despite the nitrifying bacterial population present. Thus, dissolved oxygen should be maintained at least 6 mg-O₂/L in the case of fixed biomass, and in depth if biofiltration bed is used.

Finally, it is possible, through some operational changes, to promote the development of a nitrifying bacterial flora in a process that is not originally designed for this purpose. Aeration, backwashing and inflow all have a positive impact on the development of both AOB and NOB. However, to ensure nitrification, maintaining aeration at 6 mg-O₂/L and less intensive backwashes appear to be promising solutions. Increasing hydraulic residence time did not improve nitrification, but it increased the concentration of dissolved oxygen in the interstitial fluid. This parameter promotes the diffusion of dissolved and thus reduces the associated energy demand. These results represent an advance in the understanding of the behavior of fixed biomass biofilm in the field of municipal purification and the main conclusions can easily be applied to all processes of this type, thus broadening their remediation potential.

Key words: biofiltration, attached growth biofilm, AOB and NOB, nitrification, operational parameters.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 ÉTAT DES CONNAISSANCES ET POSITIONNEMENT DE LA RECHERCHE	7
1.1 Contexte réglementaire	7
1.2 Cultures bactériennes en suspension et fixées	8
1.3 Nitrification biologique et principaux groupes bactériens impliqués	10
1.4 Paramètres de contrôle pour les cultures bactériennes en suspension ou fixées ayant une incidence sur le consortium bactérien.....	12
1.5 Méthode d'analyses du consortium bactérien et transposition.....	14
1.5.1 Analyse au microscope (FISH).....	15
1.5.2 qPCR.....	16
1.6 Études des populations relatives des AOB et NOB en eaux usées	17
1.6.1 Enlèvement de l'azote par les filtres biologiques (BAF)	18
1.6.2 Marqueurs moléculaires pour l'étude des AOB et NOB.....	18
1.6.3 Relation entre AOB, NOB et la nitrification	19
1.6.4 La polyvalence du métabolisme des NOB.....	20
1.7 Positionnement de la recherche	21
1.7.1 Problématique	21
1.7.2 Hypothèse de recherche	22
1.7.3 Objectif général et objectifs spécifiques	23
CHAPITRE 2 APPROCHE MÉTHODOLOGIQUE	25
2.1 Description détaillée de la station d'épuration d'Auteuil	25
2.1.1 Description du cadre d'échantillonnage	27
2.2 Conditions d'essai	30
2.2.1 Essai sur l'aération	31
2.2.2 Essai de modification de lavage à contre-courant.....	32
2.2.3 Essai sur l'ajustement du débit.....	32
2.3 Analyse microbiologique.....	33
2.3.1 Extraction d'ADN	34
2.3.2 Analyse qPCR sur le gène ARNr-16S	34
2.3.3 Amplification du gène <i>amoA</i> et <i>nxrB</i>	35
2.3.4 Analyse de fluorescence par hybridation <i>in situ</i> (FISH).....	36
2.4 Analyse des données	38
2.4.1 Évaluation du développement des AOB et NOB relatif à la population totale bactérienne (Article 1)	38
2.4.2 Évaluation du développement des AOB et NOB relative à la biomasse totale du biofilm et corrélation au niveau du traitement d'eau (Article 2)	39

2.4.3	Évaluation de l'efficacité de l'approche opérationnelle en vue de favoriser la nitrification dans un procédé biologique (Article 3).....	39
CHAPITRE 3	ARTICLE 1: OPERATIONAL MODIFICATIONS TO PROMOTE THE DEVELOPMENT OF NITRIFYING BIOMASS IN A NON NITRIFYING BIOLOGICAL AERATED FILTER: ASSESSMENT WITH DEGENERATED QPCR PRIMERS	41
3.1	Abstract.....	41
3.2	Introduction.....	42
3.3	Material and Methods	45
3.3.1	WWTP description and wastewater characteristics.....	45
3.3.2	Test conditions.....	47
3.3.3	Samples.....	47
3.3.4	Biofilm analysis	48
3.3.4.1	DNA extraction.....	48
3.3.4.2	qPCR 16S-rRNA.....	49
3.3.4.3	Amplification of <i>amoA</i> and <i>nxrB</i>	49
3.3.4.4	Fluorescent in situ hybridization (FISH).....	50
3.3.4.5	Data analysis.....	51
3.3.4.6	Statistical analysis.....	52
3.4	Results.....	52
3.4.1	Bacteria development in biofilter cells (qPCR 16SrRNA).....	52
3.4.2	qPCR amplification of <i>amoA</i> and <i>nxrB</i>	52
3.4.3	FISH analysis.....	56
3.5	Discussion.....	58
3.5.1	Effect of tested conditions on the development of AOB and NOB within the Bacterial population.....	58
3.6	Conclusion	61
CHAPITRE 4	ARTICLE 2: OPERATIONAL MODIFICATIONS FOR THE DEVELOPMENT OF NITRIFYING BACTERIA IN A LARGE-SCALE BIOLOGICAL AERATED FILTER AND ITS IMPACT ON WASTEWATER TREATMENT.....	63
4.1	Abstract.....	63
4.2	Introduction.....	64
4.3	Material and methods.....	65
4.3.1	WWTP description and wastewater characteristics.....	65
4.3.2	Testing conditions.....	67
4.3.3	Samples.....	68
4.3.3.1	Expended schist grain	68
4.3.3.2	Wastewater sampling and physico-chemical analysis	69
4.3.4	Biofilm analysis	70
4.3.4.1	DNA extraction.....	70
4.3.4.2	qPCR amplification of <i>amoA</i> and <i>nxrB</i>	71
4.3.5	Data analysis.....	72

4.3.6	Statistical analysis	72
4.4	Results	73
4.4.1	Physico-chemical analysis	73
4.4.2	Nitrifying and total bacteria analysis	77
4.5	Discussion	81
4.5.1	Relation between relative % of nitrifying bacteria and process yield	81
4.5.2	Effect of Aeration on overall treatment and nitrifying community	82
4.5.3	Effect of shorter and more frequent backwash on overall treatment and nitrifying community	83
4.5.4	Effect of reduced inflow rate on overall treatment and nitrifying community	84
4.6	Conclusion	85
CHAPITRE 5	ARTICLE 3 : APPROCHES OPÉRATIONNELLES POUR FAVORISER LA NITRIFICATION DANS UN BIOFILTRE AÉRÉ À FLUX DESCENDANT	87
5.1	Résumé	87
5.2	Introduction	88
5.3	Matériels et méthodes	90
5.3.1	Description de la station d'épuration et caractéristiques des eaux usées ..	90
5.3.2	Conditions expérimentales	92
5.3.3	Échantillonnage des eaux usées et analyses physico-chimique	93
5.3.4	Analyses statistiques	95
5.4	Résultats	95
5.4.1	Conditions d'aération	95
5.4.2	Paramètres modifiés de lavage	98
5.4.3	Ajustement du débit	100
5.4.4	Impacts opérationnels et estimation des coûts énergétiques	102
5.5	Discussion	107
5.5.1	Effets de l'aération sur le traitement général	107
5.5.2	Effets des modifications des paramètres de lavage sur le traitement en général	109
5.5.3	Effets de l'ajustement du débit sur le traitement en général	110
5.6	Conclusion	111
CHAPITRE 6	DISCUSSION	113
6.1	Synthèse des articles et recommandations opérationnelles	113
6.1.1	Synthèse de l'article 1 : Évaluation de la biomasse nitrifiante lors de changement opérationnel avec l'approche par amorces dégénérées	113
6.1.2	Synthèse de l'article 2 : Population relative d'AOB et NOB et performance de traitement	122
6.1.3	Synthèse article 3 : Approches opérationnelles favorisant la nitrification	125
6.1.4	Recommandations opérationnelles pour les procédés à biomasse fixée	128

6.2	Limites et portée des résultats	130
6.2.1	L'approche par qPCR et amorce dégénérée	131
6.2.2	Sites des points d'échantillonnage.....	133
6.2.3	Analyses FISH	133
6.2.4	Changements opérationnels	134
6.2.5	La biofiltration	134
6.2.6	Portée des résultats.....	135
6.3	Perspectives de recherche	135
6.3.1	Conception d'un procédé biologique de type biomasse fixée intégrant les recommandations favorisant le développement de la flore nitrifiante	136
6.3.2	Études approfondies sur le rôle des NOB et l'implication des <i>Nitrospira</i> de type <i>commamox</i>	137
CONCLUSION.....		139
ANNEXE I	RESULTS OF RELATIVE OVERALL PRESENCE OF BACTERIA (16Sr-RNA) WITHIN THE BIOFILM UNDER TESTING CONDITIONS WITH NEWLY DESIGNED QPCR PRIMERS (ARTICLE 1 and 2)	147
ANNEXE II	SPECIES AND PARTIAL NUCLEOTIDE GENE SELECTION FOR qPCR AND FISH ANALYSIS (ARTICLE 1).....	148
ANNEXE III	TEMPLATE SPECIES AND PARTIAL NUCLEOTIDE GENE SELECTION FOR qPCR ANALYSIS (ARTICLE 2)	149
LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		151

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 2.1 Paramètres suivis et fréquences d'échantillonnage.....	29
Tableau 2.2 Paramètres suivit et nombre d'échantillons prélevés.....	31
Tableau 3.1 Newly designed degenerated oligonucleotides primers for qPCR analysis.....	50
Tableau 4.1 Physico-chemical parameter monitored with limits of detection and references.....	70
Tableau 4.2 Newly designed oligonucleotides primers for qPCR analysis	72
Tableau 5.1 Paramètres physico-chimiques suivis et limite de détection.....	95
Tableau 5.2 Impacts opérationnels, rendement et demande en énergie.....	103

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 2.1	Vue en plan d'un traitement par biofiltration de type Biocarbone Tiré de Vigne (2007)26
Figure 2.2	Configuration des biofiltres et des cellules de traitements à la station d'épuration d'Auteuil, Ville de Laval.....27
Figure 2.3	Vue en coupe d'une cellule de traitement ainsi que la hauteur des points d'échantillonnage pour le schiste et l'eau usée28
Figure 3.1	Detailed plan of (A), biofilters with treatment cell (gray) and selected test cell (green) and water distribution and (B), sectional view of a media bed with each depth, as used in the current study46
Figure 3.2	Sectional view of a treatment cell with grain and wastewater sampler device.....48
Figure 3.3	Development of the nitrifying population within the biofilm samples divided in AOB and NOB as the principals nitrifying microorganisms.54
Figure 3.4	Ratio of emission intensity from FISH analysis for total biofilm volume with ATTO 647 dye for AOB analysis and with ATTO 488 dye for NOB analysis56
Figure 3.5	Confocal imagery (FISH) of a schist sample from test cell, at 2 feet depth, during the modified backwash conditions. Sectional view of 3D stack with a 20X objective57
Figure 4.1	Detailed plan of (A), biofilters with treatment cell (gray) and selected test cell (green) and water distribution and (B), sectional view of a media bed with each depth, as used in the current work.....67
Figure 4.2	Sectional view of a treatment cell with grain and wastewater sampler device.....69
Figure 4.3	Results of physico-chemical (COD, CBOD ₅ , NH ₄ ⁺ -N) under testing conditions75
Figure 4.4	Results of dissolved oxygen (mg/L) under testing conditions76
Figure 4.5	Results of relative overall presence of nitrifying bacteria (% AOB and % NOB) in the biofilm under testing conditions.....80

Figure 5.1	Plan détaillé des biofiltres, d'une cellule de traitement ainsi que des points d'échantillonnages pour l'eau usée et le schiste91
Figure 5.2	Vue sectionnelle d'une cellule de traitement avec les points et l'équipement d'échantillonnage de schiste et d'eau usée94
Figure 5.3	Résultats des essais sur l'aération, comparant la cellule test à la cellule contrôle97
Figure 5.4	Résultats des essais sur les paramètres modifiés de lavage à contre courant, comparant la cellule test à la cellule contrôle99
Figure 5.5	Résultats des essais sur l'ajustement du débit, comparant la cellule test à la cellule contrôle101
Figure 6.1	Analyse FISH d'un biofilm avec fluorochromes atto 647 (AOB), atto 488 (NOB) et marquage WGA (exopolymères)119
Figure 6.2	Test positif sur biofilm autotrophe (pilote nitrifiant) avec la sonde atto488 (NOB)120
Figure 6.3	Test négatif avec la sonde atto647 (AOB) sur biofilm hétérotrophe120
Figure 6.4	Test positif avec la sonde atto647 (AOB) sur biofilm autotrophe (pilote nitrifiant).....121
Figure 6.5	Contrôle post-PCR par électrophorèse sur gel132

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléque
<i>amoA</i>	Sous-unité A du gène codant <i>l'ammonia monooxygénase</i>
AOA	<i>Ammonia oxidizing archea</i>
AOB	<i>Ammonia oxidizing bacteria</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNr-16S	Gène codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal
atto 488	Fluorochrome atto dans le spectre 488
atto 555	Fluorochrome atto dans le spectre 555
atto 647	Fluorochrome atto dans le spectre 647
BA	Boues activées
BAF	<i>Biological aerated filter</i>
BF	Biofiltre/Biofiltration
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i>
CBOD ₅	<i>Carbonaceous biochemical oxygen demand on 5 days</i>
CEAEQ	Centre d'expertise en analyses environnementales du Québec
CSLM	<i>Confocal scanning laser microscopy</i>
C/N	Carbone/azote
C _H	Charge hydraulique
COD	<i>Chemical oxygen demand</i>
C _v	Charge volumique
comammox	<i>Complete ammonia oxydation</i>

DBO ₅ C	Demande biochimique carbonée en oxygène sur 5 jours
DCO	Demande chimique en oxygène
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
F/M	<i>Food/Microorganisms</i>
HRT	<i>Hydraulic retention time</i>
ICQ	<i>Intensity corelation quotient</i>
INRP	Inventaire national des rejets polluants
LOD	<i>Limit of detection</i>
MDDEFP	Ministère du développement durable, de l'environnement, de la faune et des parc
MDDELCC	Ministère du développement durable, de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques
NaCl	Chlorure de sodium
NH ₃	Ammoniaque
NH ₄ ⁺	Ion ammonium
N-NH ₃	Azote sous forme d'ammoniaque
N-NH ₄	Azote sous forme d'ammonium
NO ₂ ⁻	Ion nitrite
NO ₃ ⁻	Ion nitrate
NOB	<i>Nitrites oxidizing bacteria</i>
NT	Azote totale
NTK	Azote Kjeldhal
<i>nxrB</i>	Sous unité B de l'enzyme <i>nitrite oxidoreductase</i>
O ₂	Dioxygène

OTV	Omnium de traitement et de valorisation
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
PCR	<i>Polymérase chain reaction</i>
pH	Potentiel hydrogène
Ptot	Phosphore total
Q	Débit
qPCR	<i>Polymérase chain réaction</i> en temps réel / quantitative
RBS	Réacteur biologique séquentiel
ROMAEU	Règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
STEP	Station d'épuration
STEPPE	Station expérimentale des procédés pilotes en environnement
TRH	Temps de rétention hydraulique
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
TSS	<i>Total suspended solids</i>
WGA	Agglutinine de germe de blé
WWTP	<i>Wastewater treatment plant</i>

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

bp	Paires de bases
°C	Degré Celsius
Cq	Quantification cycle (seuil de détection)
g	Gramme
g/d	Gramme par jour
g/mL	Gramme par millilitre
kg	Kilogramme
kg/d	Kilogramme par jour
kWh	Kilowattheure
kWh/kg/d	Kilowattheure par kilogramme par jour
M	Molaire
m ³	Mètre cube
m ²	Mètre carré
m/h	Mètre par heure
mg/L	Milligramme par litre
m ³ /h	Mètre cube par heure
m ³ /m ² /h	Mètre cube par mètre carré par heure
min	Minute
p	Intervalle de confiance statistique
s	Seconde
t/an	Tonne par année

μg Microgramme

μL Microlitre

Δ Delta

% Pourcentage

INTRODUCTION

Au Canada, les rejets d'eaux usées de type résidentiel représentent environ 65 % de tout le débit d'eaux des égouts. Environ 18 % sont attribuables aux rejets d'eau de types industrielle et commerciale, le restant étant attribuable aux eaux de ruissellement et d'infiltration. Ces eaux usées peuvent contenir des particules, des débris, des matières en suspension, des agents pathogènes, des déchets organiques, des nutriments et quelque 200 produits chimiques connus. Il s'agit de l'une des principales sources de contaminants déversés dans les eaux canadiennes (Environnement Canada, 2001). La composition typique en demande biochimique en oxygène à 5 jours (DBO_5), en azote ammoniacal (NH_4^+) et en phosphore d'une eau usée d'origine domestique se situe à des valeurs moyennes respectives de 250 mg- O_2 /L, 15 mg-N- NH_4^+ /L et 10 mg-P/L respectivement (Bernier, Dumoulin, Paradi, & Tétreault, 2001). Selon le dernier recensement 2016 de l'Inventaire national des rejets de polluants (INRP) d'Environnement Canada, l'azote ammoniacal ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) constitue l'une des principales substances rejetées dans l'environnement (atmosphère, eau et sol) par les industries et les municipalités canadiennes avec près de 65 000 t/an, dont environ 46 000 t/an dans l'eau (Environnement Canada, 2016). Les effets de rejets d'azote ammoniacal dans les eaux de surface représentent des risques : 1) d'acidification du milieu par l'action de la nitrification biologique; 2) d'eutrophisation du milieu en stimulant la prolifération d'organismes réduisant ainsi la concentration d'oxygène dissous dans l'eau; 3) de toxicité chronique et aiguë en raison de sa forme non ionisée NH_3 ayant des effets sur l'habilité des animaux aquatiques (particulièrement les poissons) à survivre, se développer et se reproduire (Camargo & Alonso, 2006).

Depuis 2012, le *Règlement sur les effluents des systèmes d'assainissement des eaux usées* (en vertu de la Loi sur les pêches) du gouvernement du Canada encadre les rejets d'azote ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) des stations d'épuration ($\geq 100 \text{ m}^3/\text{d}$) dans les milieux récepteurs en raison des problèmes de toxicité (chronique et aiguë) liés à la forme non ionisée NH_3 de l'azote présent dans l'eau. Selon le niveau de risque, ce règlement classe les stations d'épuration existantes non conformes et précise des échéances en conséquence pour s'y conformer (2020 à 2040).

Le gouvernement du Québec a adopté son propre règlement en 2014 (Règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées) et il énonce que les effluents de stations d'épuration ($> 10 \text{ m}^3/\text{d}$) doivent être exempts de toxicité aiguë pour la truite arc-en-ciel ou la daphnie ou les deux à la fois. Plusieurs exploitants des stations d'épuration doivent ainsi entrevoir une mise à niveau de leur procédé afin d'adapter leur traitement aux nouvelles contraintes environnementales de rejet, mais peu de choix s'offrent actuellement à eux lorsque les technologies déjà en place n'ont pas été spécifiquement conçues pour l'enlèvement de l'azote ammoniacal. Ces choix se résument souvent en une rénovation complète de la station ou l'ajout d'un procédé additionnel pour répondre à la nouvelle demande. Une autre possibilité, moins coûteuse, réside dans l'amélioration des processus de traitement des installations en place en misant sur une modification des paramètres de fonctionnement.

Il existe plusieurs types de procédés biologiques de traitement des eaux. Outre les procédés mixtes, ils se définissent principalement selon deux grandes familles en fonction du développement de la microflore bactérienne : les systèmes à biomasse en suspension et les systèmes à biomasse fixée. La conception des systèmes de traitement biologique à culture en suspension et à culture fixée diffère en raison de leurs caractéristiques microbiologiques distinctes. Dans le cas des systèmes à culture en suspension, la masse de bactéries présente dans le réacteur constitue le facteur principal responsable du rendement d'élimination d'un polluant (Metcalf & Eddy, 2014). Dans le cas d'une culture fixée, l'activité métabolique du biofilm n'est pas proportionnelle à la quantité de biomasse. En fait, il s'avère que les biofilms minces ($50 \text{ }\mu\text{m}$) favoriseraient le processus de nitrification et l'enlèvement de certains micropolluants (Torresi et al., 2016).

Les systèmes à biomasse en suspension, dont le plus répandu est le procédé de type « boues activées », consistent en un réacteur ou bassin d'aération dans lesquels une liqueur mixte composée d'eaux usées et de microorganismes en croissance est constamment agitée sous l'effet d'une aération ou d'un mélange mécanique de surface. À l'étape classique de décantation qui suit, les microorganismes s'agglutinent grâce à la génération d'exopolymères

(polysaccharides), ce qui mène à la formation des flocs biologiques possédant normalement d'excellentes propriétés de décantation favorables à leur séparation avec l'eau traitée. Plus récemment, des membranes immergées sont utilisées pour séparer la biomasse de l'eau traitée plutôt que par décantation. Les systèmes de boues activés sont toutefois sensibles aux chocs hydrauliques et toxiques, susceptibles de survenir lorsque le réseau en amont est unitaire ou s'il comporte une composante industrielle.

Les systèmes d'épuration à cultures en suspension ont bénéficié au fil des années de l'avantage qu'ils répondent bien aux prévisions proposées par les modèles mathématiques et sont devenus par le fait même plus aisés à contrôler et à mettre en œuvre. Ces modèles mathématiques ont évolué avec la compréhension plus approfondie du système qu'ont apporté les études microbiologiques sur la dynamique interne du processus de traitement. En effet, un travail scientifique d'envergure a été effectué sur les systèmes à culture en suspension, ce qui a permis d'identifier les principaux microorganismes évoluant dans le système, leurs activités métaboliques, leur rôle ou leur contribution au traitement des eaux usées ainsi que les mécanismes impliqués dans le rendement global.

Les systèmes à biomasse fixée, moins répandus à l'échelle québécoise, mais populaire à travers le monde, demeurent encore à ce jour plus complexes à maîtriser, notamment en raison de la composition du biofilm qui varie en fonction du parcours de l'eau et de ses caractéristiques. Ce type de système comprend, entre autres, les biodisques, les lits percolant (lits bactériens) et les filtres biologiques aérés (BAF) submergés à courant ascendant et à courant descendant. Ce type de système de traitement est en général réputé pour sa meilleure résilience face aux chocs toxiques et hydrauliques, tout en assurant les performances épuratoires attendues. Pour certains d'entre eux, en particulier les BAF, des problèmes de fonctionnement ont été rencontrés, ceux-ci étant directement associés à une compréhension insuffisante de la dynamique microbiologique du procédé en lien avec les paramètres opérationnels (aération, lavages, etc.). Dans le cas des cultures fixées, les travaux de recherche réalisés ont montré que la structure du biofilm était en lien direct avec les performances de traitement (van Loosdrecht et al., 1995). Toutefois, peu de travaux de

recherche ont mis en lumière les liens existants entre la composition des microorganismes au sein du biofilm et le traitement qui en résulte.

D'un point de vue microbiologique, plusieurs méthodes ou outils (PCR, qPCR, microscopie confocale CSLM et électronique SEM, hybridation fluorescente in situ [FISH], analyses génétiques, etc.) ont été développés pour étudier la biomasse dont celle présente dans les systèmes de traitement. La plupart de ces outils ont été conçus pour répondre au contexte d'une culture bactérienne en suspension dans son milieu aqueux. Bien que les cultures fixées peuvent présenter des microorganismes comparables à celles présentes dans les cultures en suspension, la structure dans laquelle ils se développent (biofilm composé principalement de polysaccharides) et la variabilité de la composition sont bien différentes. Cette différence cause la plupart du temps une contrainte importante au moment de transposer les méthodes d'analyses microbiologiques développées pour les systèmes à culture en suspension vers les systèmes à culture fixée.

Objectif général

L'objectif général de la thèse consiste à évaluer la possibilité de favoriser le développement d'une biomasse nitrifiante au sein d'un procédé de biofiltration à pleine échelle (*Biocarbone*®) qui n'a pas été initialement conçu pour le processus de nitrification grâce à l'ajustement de ses paramètres de fonctionnement. Pour espérer une amélioration du processus de nitrification au sein d'un tel procédé, une meilleure compréhension du consortium bactérien en fonction des paramètres opérationnels s'avère essentielle. Pour se faire, une approche novatrice par qPCR avec amorces dégénérées ainsi que des analyses FISH par imagerie confocale sont proposées afin d'évaluer le développement des principales familles de bactéries responsables du processus de nitrification, soumis à trois conditions expérimentales directement liées aux paramètres opérationnels du procédé : l'aération, le lavage à contre-courant ainsi que le débit. Cette thèse s'adresse aux travailleurs en station d'épuration ainsi qu'à la communauté scientifique œuvrant dans l'étude microbiologique des biofilms.

Structure de la thèse

Cette thèse est composée de six chapitres. Le premier chapitre présente un état des connaissances en lien avec le champ de recherche de la thèse. Ce chapitre inclut également un positionnement de la recherche, les hypothèses de recherche proposées, ainsi que l'objectif général et les objectifs spécifiques. Le deuxième chapitre détaille l'approche méthodologique du projet. Il aborde, entre autres, les méthodes de prélèvements des échantillons d'eau et de biofilms à différentes profondeurs dans le lit filtrant, la description de la station d'épuration à l'étude et les conditions opératoires testées, les méthodes d'analyses de suivi de la qualité d'eau en station ainsi que les méthodes d'analyses microbiologiques du biofilm. Les trois chapitres suivants sont consacrés aux articles scientifiques soumis pour publication au cours de la thèse. Le troisième chapitre (article 1) présente une analyse du développement des bactéries nitrifiantes en fonction de la profondeur des échantillons recueillis, et ce, en lien avec les paramètres opérationnels étudiés. Le quatrième chapitre (article 2) cherche à établir les liens entre la population relative des bactéries nitrifiantes et la résultante de traitement sur les principaux paramètres suivis en station d'épuration. Le cinquième chapitre (article 3) réside en une analyse approfondie de l'effet des différents paramètres opérationnels testés sur le rendement de la station et en une estimation de la meilleure stratégie à adopter afin de favoriser la croissance d'une biomasse nitrifiante au sein d'un procédé qui techniquement n'est pas conçu pour la nitrification. Le sixième chapitre est consacré à une discussion relative sur les principaux résultats obtenus tout en précisant les limites de la thèse ainsi que les retombées escomptées. Une conclusion complète le document présentant un résumé des principaux résultats ainsi que des perspectives de recherche.

CHAPITRE 1

ÉTAT DES CONNAISSANCES ET POSITIONNEMENT DE LA RECHERCHE

Ce chapitre présente d'abord l'état des connaissances sur le contexte réglementaire et sur les cultures à biomasses fixées. Une revue des principales méthodes microbiologiques utilisées pour évaluer la composition d'un biofilm bactérien est ensuite présentée. Elle est suivie d'une synthèse des études portant sur la nitrification en eaux usées et la quantification de la biomasse nitrifiante afin de déterminer d'une part, l'état actuel des connaissances, et d'autre part, d'en soulever les différentes conclusions permettant de positionner la présente recherche. Enfin, la présentation de la problématique de recherche, les hypothèses de recherche, l'objectif général et les objectifs spécifiques viennent clore ce chapitre.

1.1 Contexte réglementaire

Le 17 février 2009, le Conseil Canadien des Ministres de l'Environnement (CCME), en accord avec les ministres des différents territoires (fédéral, provinciaux et territoriaux), a adopté la Stratégie pancanadienne pour la gestion des effluents d'eaux usées municipales. Cette stratégie visait plus de 3500 ouvrages d'épuration des eaux usées au pays, et de doter les exploitants de ces stations d'une vision claire de la réglementation applicable quant à des performances à atteindre pour mieux protéger la santé humaine et l'environnement. Cette stratégie s'est traduite en 2012 par le *Règlement sur les effluents des systèmes d'assainissement des eaux usées* en vertu de la Loi sur les pêches du gouvernement du Canada (Environnement Canada, 2012). Ce règlement, qui vise les stations d'épuration d'au moins 100 m³/d, classe les stations existantes non conformes et indique des échéances séquentielles pour les propriétaires ou l'exploitant d'un système d'assainissement pour s'y conformer (2020 à 2040). En vertu de ce règlement, l'effluent des stations d'épuration doit satisfaire, entre autres, des valeurs égales et inférieures à 25 mg/L en DBO₅ et MES respectivement ainsi qu'une concentration maximale d'ammoniac non ionisé (NH₃) dans l'effluent inférieure à 1,25 mg/L (exprimée sous forme de N à 15°C ± 1°C). L'azote NH₃ non ionisé prend toute son importance par le fait qu'une concentration trop importante dans les

eaux de surface amène des problèmes de toxicité aiguë affectant directement les poissons ou encore de toxicité chronique affectant les poissons et les populations d'invertébrés benthiques (Driscoll et al., 2003; Satin & Selmi, 2006). Le gouvernement du Québec a également adopté son propre règlement en 2014 [*Règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées*, ROMAEU (Gouvernement du Québec, 2014)]. Applicable aux effluents de stations d'épuration présentant un débit supérieur à 10 m³/d, les seuils réglementaires pour la DBO₅ et les MES sont les mêmes que pour le règlement fédéral (25 mg/L), tandis que les effluents doivent être exempte de toxicité aiguë pour la truite arc-en-ciel ou la daphnie ou les deux à la fois. La toxicité liée à l'ammoniac non ionisé (NH₃) est donc assimilée à celle évoquée par le règlement.

1.2 Cultures bactériennes en suspension et fixées

L'enlèvement de l'azote ammoniacal des eaux usées repose le plus souvent sur des approches biologiques, soit sur la base de systèmes où la culture bactérienne est en suspension complète (ex. : boues activées, lagunes complètement mélangées, etc.) ou partielle (ex. : lagunes naturelles), ou encore des systèmes à cultures bactériennes fixées à un milieu de support (disques biologiques, biofiltration, etc.). L'azote ammoniacal est communément enlevé par ces systèmes par un processus de nitrification biologique (Daims & Wagner, 2010). Elle consiste à une transformation de l'azote ammoniacal en nitrites puis en nitrates (celui-ci étant moins nocifs pour les cours d'eau récepteurs) par les bactéries naturellement présentes dans les eaux.

Dans un système à cultures bactériennes en suspension, la masse bactérienne est supposée uniforme dans la totalité du réacteur (Metcalf & Eddy, 2014) et présente de grands avantages d'analyse et de modélisation du système. Un échantillon d'eau contenant les bactéries, dans ce contexte, est représentatif de tout le bassin et fournit les renseignements nécessaires pour comprendre l'état du consortium bactérien. Il n'est donc pas nécessaire de définir la disposition spatiale de la microflore bactérienne. Cette particularité des systèmes à boues activées permet alors la mise au point de modèles mathématiques estimant le comportement

de la microflore avec une bonne précision (Henze, 2000). De plus, la masse totale de microorganismes par unité de volume dans le bassin est directement proportionnelle au taux d'enlèvement du système de traitement. Toutefois, ce type de développement microbien est sensible aux conditions adverses parfois rencontrées dans les eaux usées ainsi qu'aux chocs hydrauliques, surtout lorsque le réseau en amont est unitaire ou comporte une composante industrielle (Metcalf & Eddy, 2014).

Dans le cas d'une culture bactérienne fixée, la biomasse se compose d'une multitude de microorganismes supportés par un milieu (pierre, plastiques) formant ainsi un biofilm. Les bactéries sont alors réparties de manière hétérogène dans le volume du biofilm. Ce type d'organisation est celui le plus fréquemment rencontré dans l'environnement (Jefferson, 2004). La culture bactérienne fixée, à l'opposé de celle en suspension, est plus résistante et résiliente en cas de stress environnementaux, de chocs toxiques ou de variations drastiques de disponibilité en nutriments (Chen, Ling, & Blancheton, 2006; Metcalf & Eddy, 2014). De plus, les biomasses fixées ne risquent pas d'être lessivées par les à-coups de débits (Morgenroth & Wilderer, 2000) et ont fait preuve d'excellent taux de nitrification (Chen et al., 2006). En aucun cas, l'uniformité de la masse bactérienne dans un tel système ne peut être supposée, ce qui explique les difficultés à modéliser le processus de traitement, et en particulier la nitrification qui en résulte (Devinny & Ramesh, 2005). En plus d'être un écosystème complexe qui varie sur toute l'épaisseur d'un biofilm, le consortium bactérien présente également des différences au niveau de la structure et du rôle métabolique en fonction du parcours de l'eau. Il se crée également un gradient de concentration des éléments nutritifs à l'intérieur du film bactérien et à l'intérieur du bassin de traitement (Vanhooren, 2002). Ce gradient de concentration présente un impact sur le développement du biofilm microbien.

Par ailleurs, contrairement aux cultures bactériennes en suspension, la masse de bactéries fixées sur le milieu de support n'est pas nécessairement proportionnelle à la performance du système, et en particulier pour l'enlèvement de l'azote par processus de nitrification. L'analyse des bactéries au sein du biofilm est donc de mise afin d'en contrôler le

développement et assurer une bonne performance de traitement. Toutefois, ces analyses sont complexes au sein d'une culture fixée en raison de la structure du biofilm ainsi que l'hétérogénéité des espèces bactériennes qui le compose (Edwards, 1999; Lazarova & Manem, 1995; Wimpenny, Manz, & Szewzyk, 2000). Une différence majeure quant à la masse totale de biomasse entre une culture en suspension et une culture fixée est la production de polysaccharides (exopolymères). La matrice extracellulaire produite lors de la formation du biofilm peut représenter jusqu'à 50 % du poids total mesuré (Lazarova & Manem, 1995). Dans le cas de cultures bactériennes en suspension (ex. : boues activées), les exopolymères (polysaccharides) sont formés à l'étape de décantation permettant alors aux microorganismes de s'agglutiner, de former des floccs et sédimenter. Il est également intéressant de définir les principales espèces bactériennes constituant la biomasse puisque leur activité métabolique spécifique est plus importante que leur nombre total dans le bassin de traitement.

1.3 Nitrification biologique et principaux groupes bactériens impliqués

La nitrification biologique est un processus chemolithoautotrophe se déroulant en deux étapes distinctes dont la finalité est le nitrate (NO_3^-). Les principaux microorganismes responsables de ce processus font partis du groupe des *Ammonia-oxidizing Bacteria* (AOB) qui appartiennent aux protéobactéries de type β et γ , des *Nitrite-oxidizing Bacteria* (NOB) et des *Ammonia-oxidizing Archea* (AOA) (Koops, Purkhold, Pommerening-Röser, Timmermann & Wagner, 2006; Lavergne, 2014; Stahl & Torre, 2012; Teske et al., 1994). Les bactéries de type AOB et NOB sont considérées comme étant les bactéries dominantes dans un biofilm nitrifiant (Foesel et al., 2008; Kindaichi, Kawano, Ito, Satoh & Okabe, 2006; Li et al., 2015) et leur relation biochimique est bien connue, d'où leur utilisation principalement lors de traitements tertiaires de procédés par boues activées (Blackall & Burrell, 1999). Par contre, les tentatives d'utiliser ces relations biochimiques en une seule étape dans un procédé de type biomasse fixée s'est avéré être plutôt complexe et difficilement applicable (Bovendeur, Zwaga, Lobee & Blom, 1990). Les bactéries *Nitrosomonas* sont les plus communes parmi les AOB observées dans un biofilm nitrifiant (Foesel et al., 2008) et

elles sont responsables de l'oxydation du NH_4^+ en NO_2^- , aussi appelée la nitrification. Une des enzymes impliquées dans cette transformation est l'« ammonia monooxygénase », permettant la formation d'hydroxylamine (NH_2OH) à partir du NH_4^+ . La sous unité catalytique α de cette enzyme est encodée par le gène *amoA* présent chez toutes les bactéries et AOA ayant l'aptitude de faire de la nitrification (Schleper, Jurgens & Jørgensen, 2005). Pour cette raison ainsi que le fait que ce gène s'est bien conservé au fil de l'évolution, il est employé comme marqueur moléculaire pour l'étude des communautés d'AOB et d'AOA.

Ensuite, les nitrites (NO_2^-) sont oxydés par les NOB par l'entremise de l'enzyme nitrite-oxydoréductase afin de former les nitrates (NO_3^-) (Meincke, Bock, Kastrau & Kroneck, 1992). Les *Nitrobacters*, présents dans les sols et les eaux usées, ont longtemps été considérés comme étant les principales bactéries du groupe des NOB, responsables de la nitrification. Toutefois, des études plus récentes ont démontré que les bactéries dominantes du groupe de NOB dans les eaux usées feraient en fait partie des *Nitrospira* (Blackburne, Vadivelu, Yuan & Keller, 2007; Foesel et al., 2008; Juretschko et al., 1998; Nogueira & Melo, 2006; Schramm, de Beer, Wagner & Amann, 1998; Yao & Peng, 2017). Il a également été démontré que les *Nitrospira* ont une polyvalence métabolique leur conférant un avantage lors de la compétition microbienne pour les substrats disponibles (Koch et al., 2015). Parmi ces bactéries, une nouvelle espèce de *Nitrospira* récemment découverte (*comammox* ou *COMplete AMMonia OXidiser*) peut métaboliser complètement le NH_4^+ en NO_3^- (Daims et al., 2015). Cette bactérie pourrait donc être prépondérante dans la communauté nitrifiante. Les travaux de Winkler et al. (2012) proposent même que certaines espèces de NOB, en raison de leur polyvalence métabolique, puissent être pleinement indépendantes des AOB pour l'accès aux substrats telles que les NO_2^- . D'ailleurs, il apparaît dans plusieurs études que les NOB sont le groupe de bactéries dominantes au sein de la population nitrifiante, en particulier lorsque les conditions environnementales sont favorables à leur développement, tel que le temps de contact du substrat avec le biofilm (Daims, Nielsen, Nielsen, Juretschko & Wagner, 2000; Dionisi et al., 2002; Winkler et al., 2012). Afin d'étudier les NOB par le biais d'un marqueur génétique, le gène *nxrB*, codant la sous-unité catalytique β de l'enzyme nitrite-oxydoréductase, s'avère idéal puisque ce gène est requis pour toutes les NOB.

1.4 Paramètres de contrôle pour les cultures bactériennes en suspension ou fixées ayant une incidence sur le consortium bactérien

Certains paramètres opérationnels peuvent avoir une incidence sur le consortium bactérien. La plupart des études précédentes ont été effectuées sur les biomasses en suspension, mais quelques études se sont penchées sur les biomasses fixées.

Les paramètres à contrôler qui ont une incidence directe sur la microflore dans un bassin à boues activées sont le ratio « Food/Microorganisms » ou F/M (Awolusi, Nasr, Kumari & Bux, 2016), le ratio C/N par l'entremise d'analyses telles que la Demande Biochimique en Oxygène (DBO), la Demande Chimique en Oxygène (DCO), le NH_4^+ , les NO_2^- , les NO_3^- et l'azote Kjeldhal (NTK) (He et al., 2017; J.-O. Kim et al., 2015; Wei, Du, Xue, Dai & Zhang, 2014), l'âge des boues, le temps de rétention hydraulique (Awolusi et al., 2016) ainsi que l'oxygène dissous. Si le ratio F/M et l'oxygène dissous sont trop faibles, il y aura prolifération de bactéries filamenteuses indésirables qui occasionneront des problèmes de production de mousses dans le bassin d'aération, de décantation des boues dans le clarificateur secondaire ainsi qu'un mauvais rendement à l'effluent (Metcalf & Eddy, 2014; Von Sperling, 2007). Une analyse au microscope optique permet de visualiser la présence de bactéries filamenteuses par leurs formes caractéristiques. La DBO a un impact significatif sur la nitrification. Pour que la nitrification ait lieu, la DBO sous sa forme soluble doit être la plus faible possible. En présence de matière organique, la prolifération de bactéries nitrifiantes autotrophes est ralentie par compétition par la croissance des bactéries hétérotrophes qui consomme l'oxygène dissous pour assurer leur développement. Ainsi, la nitrification ne peut avoir pleinement lieu. Finalement, l'oxygène dissous doit constamment être en quantité suffisante pour le bon développement et le maintien des bactéries dans le procédé. Il est suggéré de maintenir en tout temps une concentration en oxygène dissous de près de 2 mg- O_2 /L afin qu'il ne soit pas un facteur limitant au fonctionnement normal du procédé (Metcalf & Eddy, 2014).

Les paramètres à surveiller dans le cas d'un système de traitement à biomasse fixée sont essentiellement les mêmes que dans le cas des boues activées, sauf le ratio F/M qui est plus

spécifique à ce type de système, mais il ne présente pas le même impact sur le développement bactérien. Une DBO élevée ou trop faible aura comme incidence de développer une épaisseur excessive du biofilm et d'augmenter ainsi le risque de colmatage dans le cas de système de biofiltration (Mendoza-Espinosa & Stephenson, 1999; Pramanik, Fatihah, Shahrom & Ahmed, 2012). Contrairement aux traitements par boues activées, l'épaisseur du biofilm (ou quantité de matière totale) n'est pas directement en lien avec la portion de biomasse active. En présence d'une concentration élevée de matières organiques, les bactéries se développent avec abondance (Jefferson, 2004), ce qui aura tendance à épaissir le biofilm (Flemming, 2002; Liu, Liu, Cui & Zhang, 2012). Si la concentration de matière organique est faible, les bactéries auront tendance à sécréter davantage de polysaccharides plutôt que de nouvelles cellules. Cette couche de polysaccharides ou d'exopolymères agit comme barrière protectrice pour les bactéries et aussi comme filtre afin de recueillir le maximum de nutriment circulant dans le milieu (Flemming, 2002). Cela aura donc comme effet d'épaissir significativement le biofilm. Plus le biofilm est épais, plus le risque de colmatage des systèmes de biofiltration augmente. De plus, certaines études menées sur les systèmes de biofiltration ont démontré que l'épaisseur du biofilm décroisse grandement en fonction de la profondeur du filtre, réduisant ainsi la compétition entre les bactéries hétérotrophes et autotrophes pour leur développement (Antoniou et al., 1990; Kindaichi et al., 2006; Torresi et al., 2016). Un lavage à contre-courant est ainsi effectué sur les biofiltres afin d'en limiter le colmatage; le lavage assure alors à la fois le retrait d'une bonne partie de la biomasse excédentaire par cisaillement et l'élimination des dépôts accumulés sur le filtre. Le lavage des filtres est généralement vigoureux et survient en moyenne une fois par jour pour chaque filtre. Cependant, il s'avère que les lavages à contre-courant ont également un effet sur le consortium bactérien. Il a été démontré par Feng et al. (2017) que les lavages des filtres biologiques ont une incidence au niveau des genres microbiens présents dans le biofilm. Les effets des lavages sur des microorganismes précis ainsi que leur incidence sur l'efficacité du traitement demeurent toutefois peu connus. Une étude récente sur les lavages d'un système de filtration biologique sur support membranaire relève une amélioration du traitement au niveau de l'enlèvement de la DCO et du N-NH_4^+ , mais cette étude ne tient pas compte du temps de récupération nécessaire pour le

traitement des eaux usées ni de l'impact sur la communauté microbienne (Hasnain, Khan, Arshad & Abdullah, 2017). En ce qui concerne l'oxygène dissous, une concentration de 2 mg-O₂/L telle qu'employée dans les boues activées pourrait constituer une concentration limitante pour les biomasses fixées, créant ainsi une zone anoxique dans les parties profondes du biofilm (Li et al., 2004). La littérature rapporte que les concentrations d'oxygène dissous dans la phase liquide devraient être maintenues au-dessus de 4 mg-O₂/L (Boller, Gujer & Tschui, 1994) et même à 6 mg-O₂/L (Vidal, Combeau, Costa & Le Tallec, 1997; Zhao, Woods, Parker & Hong, 2006).

Le pH, la température, les forces hydrodynamiques de cisaillement et la toxicité du milieu jouent également un rôle sur le consortium bactérien. Par exemple, un pH non favorable dans un système à boues activées engendre la prolifération de bactéries filamenteuses, une faible température réduit la biomasse active d'un système à culture fixée, des forces de cisaillements trop faibles produiront un biofilm bactérien fragile et facilement détachable et la toxicité du milieu peut décimer la population bactérienne (Chen et al., 2006; Hermanowicz, 1999).

1.5 Méthode d'analyses du consortium bactérien et transposition

Afin d'évaluer l'état d'un biofilm sur la base de sa population microbienne qui le constitue, plusieurs méthodes d'analyse du consortium bactérien peuvent être utilisées dont quelques-unes seront présentées dans cette section. Toutefois, il est difficile de transposer directement pour une culture fixée une méthode d'analyse préalablement conçue pour les cultures en suspension telles que les boues activées. De plus, ces techniques ont été développées pour être efficaces avec des cultures pures de microorganismes et sont donc moins opérantes lorsqu'employées avec des échantillons environnementaux qui possèdent un contexte biologique complexe, des agents inhibiteurs interférant avec l'isolation des acides nucléiques ou peu de matériels génétiques (Chandler, 1998). Cette section fait un survol de la question et en présente une synthèse. Comme cité précédemment, la différence entre les deux types de

cultures bactériennes (en suspension ou fixées) fait en sorte que la plupart des analyses ne peuvent pas présenter la même approche expérimentale.

1.5.1 Analyse au microscope (FISH)

Les analyses de structure d'un biofilm à cultures bactériennes fixées par microscopie doivent préalablement être ajustées ou adaptées par rapport à une utilisation pour des cultures en suspension (ex. : boues activées). En effet, étant donné qu'il existe une relation directe entre la structure d'un biofilm à biomasse fixée et les performances de traitement, les analyses au microscope doivent observer le biofilm sans en altérer sa composition (Lawrence & Neu, 1999). Cette étape n'est pas nécessaire lors de l'étude de cultures bactériennes en suspension puisque la structure de celles-ci a peu d'impact sur le traitement. Les analyses d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) par microscopie confocale sont particulièrement sensibles et une mise au point de la technique pour l'observation d'un biofilm à biomasse fixée sur un média comme un grain de schiste expansé est nécessaire afin de minimiser l'altération de l'échantillon.

L'identification des microorganismes présents dans un biofilm permet de mieux estimer son potentiel d'activité métabolique. Pour ce faire, les avancées technologiques en génétique bactérienne ont permis l'élaboration de marqueurs phylogénétiques (ex. : sondes d'oligonucléotides à ARNr-16S) couplés avec une molécule fluorescente pouvant ainsi être observée à l'aide d'un microscope confocale ou épifluorescence (Pernthaler, Glöckner, Schönhuber & Amann, 2001). Les sondes d'oligonucléotides peuvent parfois être couplées avec un anticorps spécifique afin de cibler une espèce précise ou même une structure cellulaire particulière. Ce type d'analyse est efficace pour détecter des bactéries spécifiques et, lorsque couplé à un microscope confocale, permet d'analyser l'organisation spatiale d'une communauté microbienne complexe par imagerie tridimensionnelle (Falkentoft et al., 2002; Wagner, Horn & Daims, 2003). Elle a également été employée pour des analyses de plusieurs espèces bactériennes simultanément (Thurnheer, Gmür & Guggenheim, 2004).

Les oligonucléotides à ARNr-16S offrent l'avantage qu'ils sont présents dans tous les organismes vivants. Un grand nombre de copies de l'ARNr-16S se retrouve par cellule, ce qui améliore la limite de détection du test et, conséquemment, un grand nombre de séquences de différents organismes sont emmagasinés dans les bases de données (Kim et al., 2012). Ce test constitue un outil puissant qui permet l'analyse de biofilm bactérien dans son état naturel. Le test FISH permet d'étudier avec plus de précision une matrice cellulaire et peut être adapté pour l'étude des cultures fixées (Aoi et al., 2000).

Lorsque couplées à la microscopie confocale, les analyses FISH permettent également l'observation de la distribution spatiale dans le biofilm. Avec une résolution suffisante, habituellement obtenue avec des échantillons classiques pouvant aller jusqu'à un grossissement de 1000x, un logiciel de traitement d'image peut procéder à un décompte du nombre de bactéries ainsi marqué par la technique FISH. Cela permet un dénombrement direct des espèces ciblées ainsi que de valider s'il y a colocalisation ou non des différents groupes étudiés. Toutefois, lorsque l'observation à fort grossissement est impossible, telle qu'un échantillon de biomasse fixée sur un support irrégulier, Li et al. (2004) ont développé la technique du quotient de corrélation d'intensité (ICQ) permettant ainsi d'estimer la présence des microorganismes ciblés par rapport à l'échantillon dans son ensemble.

1.5.2 qPCR

L'analyse de réaction en chaîne par polymérase (PCR) est basée sur une réaction enzymatique d'amplification de l'ADN. Lorsqu'elle est quantitative ou en temps réel (qPCR), le produit de la réaction est mesuré en continu. Cela permet d'estimer la quantité initiale d'ADN dans l'échantillon. La PCR est en fait une amplification cyclique d'une région d'ADN ciblée (souvent un gène) par des amorces d'oligonucléotides spécifiques. Ces amorces peuvent être suffisamment sensibles pour amplifier un segment d'ADN provenant uniquement des bactéries nitrifiantes (en se basant sur les gènes *amoA* et *nxrB* spécifiques) parmi tous l'ADN présent dans l'échantillon. Si le nombre de copies initiales du gène ciblé par la réaction est connu, il est alors possible d'estimer la quantité de ces microorganismes au

sein de l'échantillon. Ainsi, les travaux de Dionisi et al. (2002) et Klappenbach et al. (2001) ont permis d'évaluer la présence relative de la population bactérienne au sein d'un biofilm en estimant le nombre de copies du gène ciblé (la sous-unité 16S du gène ribosomal, ARNr-16S) à 3,6 par génome bactérien. L'estimation de la masse génomique bactérienne moyenne a été, quant à elle, évaluée à $6,72 \times 10^{-12}$ µg/cellules (Bak, Christiansen & Stenderup, 1970; Dolezel, Bartos, Voglmayr & Greilhuber, 2003; Gillis, Ley & Cleene, 1970). Toutefois, ce test reste sensible aux impuretés et il est rarement utilisé pour des analyses sur des échantillons environnementaux. La sensibilité du test constitue également une de ses limites, car cela empêche généralement une analyse plus étendue du spectre bactérien d'intérêt. La majorité des amorces connues pour des analyses qPCR sont propres à une espèce précise au lieu de cibler la famille au sens large. Cela induit donc fort probablement une sous-estimation de la population (Schefe, Lehmann, Buschmann, Unger & Funke-Kaiser, 2006). Par contre, une corrélation entre les analyses FISH et la PCR ont déjà été établies par les travaux de Baptista et al. (2014) permettant de corroborer ainsi des observations faites sur un biofilm avec deux techniques différentes. Il s'avère beaucoup plus facile d'effectuer le test qPCR sur des échantillons de cultures bactériennes en suspension (boues activées), car il n'y a nul besoin d'isoler un biofilm. La difficulté d'effectuer cette analyse sur des cultures bactériennes fixées est la récupération du biofilm en soi. Des impuretés venant directement du support du biofilm lors de la récupération peuvent aussi être présentes (Ginzinger, 2002; Wilson, 1997). Ces impuretés peuvent affecter la qPCR (Chandler, 1998). Une méthode rigoureuse de récupération du biofilm doit être respectée afin d'en recueillir le maximum sur le milieu de support pour des analyses représentatives.

1.6 Études des populations relatives des AOB et NOB en eaux usées

Cette section synthétise les résultats des différents travaux de recherche traitant de l'étude des populations relatives d'AOB et NOB dans un contexte d'épuration des eaux usées et en particulier lors du traitement par biofiltration.

1.6.1 Enlèvement de l'azote par les filtres biologiques (BAF)

Les travaux réalisés par Pramanik et al. (2012) ont montré que les filtres biologiques aérés avaient la capacité d'être plus efficaces que les boues activées pour l'enlèvement de l'azote. D'ailleurs, Gieseke et al. (2003) rapportent que les NOB sont beaucoup plus sensibles que les AOB lors de baisses de l'oxygène dissous, de chocs toxiques, de variations de pH et de température lorsque le milieu de culture est en suspension, d'où l'importance d'assurer un contrôle étroit dans des procédés de type boue activée. La littérature scientifique rapporte peu d'études sur l'efficacité des filtres biologiques aérés, surtout en ce qui a trait à des applications en conditions réelles de traitement des eaux usées, et plus spécifiquement au niveau de l'enlèvement de la charge azotée par rapport à la présence relative des bactéries. De ce fait, Li et al. (2016) rapportent que les seules corrélations établies entre la population bactérienne et l'efficacité du traitement ont été observées en laboratoire (échelle pilote). La relation entre le potentiel de nitrification d'un bioprocédé et l'estimation de la population de bactéries nitrifiantes demeure à être étudiée.

1.6.2 Marqueurs moléculaires pour l'étude des AOB et NOB

Afin d'étudier la population des principaux groupes bactériens responsables de la nitrification au sein d'un biofilm, des techniques d'analyse basées sur les séquences génétiques, tel que la PCR ou la qPCR ou PCR en temps réel, ont été mises au point. Les séquences d'ARN ribosomal 16S ont été largement utilisées en tant que marqueur moléculaire en écologie microbienne en raison de leur caractère essentiel au fonctionnement bactérien, et dû au fait que cette séquence génétique se retrouve dans toutes les bactéries ainsi que de leurs propriétés évolutives (Case et al., 2007). Cependant, l'utilisation de ce marqueur peut parfois conduire à une mauvaise interprétation, car plusieurs copies de ce gène présentant des différences de séquence peuvent être présentes au sein d'un même organisme. Afin de corriger ce problème lors de l'étude des bactéries AOB, les travaux de McTavish et al (1993) ont proposé l'utilisation du gène codant la sous-unité A de l'ammonium monooxygénase (*amoA*). Ce gène est ubiquitaire à toutes les bactéries nitritantes et est spécifique à chaque espèce d'AOB. Ce gène est également présent chez les AOA. En ciblant un gène qui est

associé à une caractéristique métabolique spécifique comme marqueur moléculaire pour des groupes de bactéries distincts, la précision de la méthode s'en trouve ainsi grandement améliorée. Dionisi et al. (2002) ont utilisé le gène *amoA* lors d'essais de PCR compétitive afin d'évaluer la présence relative des AOB au sein d'une biomasse en suspension. Ces travaux ont conduit à une amorce génétique spécifique à une espèce précise de *Nitrosomonas* et toutes les estimations de présence relative des AOB ont été fondées sur cette espèce. Les chercheurs ont par ailleurs estimé que les *Nitrosomonas* présentent deux copies du gène *amoA* par génome.

Dans le même ordre d'idée, afin d'étudier la présence relative des bactéries NOB, les travaux de Pester et al (2014) et Gruber-Dorninger (2015) ont suggéré l'utilisation du gène codant la sous unité B de l'enzyme « nitrite oxido-reductase » (*nrxB*). Ce gène est présent chez toutes les NOB et est nécessaire pour la métabolisation des nitrates à partir des nitrites. Plusieurs copies de ce gène sont présentes au sein des différentes espèces bactériennes du groupe des NOB. Ces mêmes chercheurs ont déterminé que le nombre de copies de ce gène variait de deux à six pour un large spectre d'espèces de NOB. Ainsi, en regroupant un maximum de NOB, l'estimation à quatre copies du gène *nrxB* par génome bactérien permet d'englober en moyenne toutes les espèces de NOB présentes dans un biofilm hétérogène complexe.

1.6.3 Relation entre AOB, NOB et la nitrification

Tel que démontré par Graham et al. (2007), la relation entre AOB et NOB pour la nitrification est imprédictible, mais une corrélation entre les deux a été clairement définie. Ces chercheurs ont émis l'hypothèse que les deux groupes bactériens devaient croître en collocation dans le biofilm afin de faciliter les échanges métaboliques. Lors d'essais menés par Dionisi et al. (2002) et Harms et al. (2003) sur les populations relatives des bactéries nitrifiantes, leurs observations ont montré que la population d'AOB semble être inférieure aux NOB. Toutefois, aucun abattement de nitrification a été rapporté en lien avec les populations présentes. Ainsi, la présence des bactéries nitrifiantes uniquement n'est pas garante de l'efficacité du traitement projeté. Par contre, plusieurs études ont rapporté que lors

d'une nitrification fonctionnelle, la population relative de NOB devrait être logiquement supérieure à la présence relative des AOB (Daims, Nielsen, Nielsen, Schleifer & Wagner, 2001; Dionisi et al., 2002; Gieseke et al., 2003; Harms et al., 2003). Ce sujet reste toutefois à être étudiée plus en profondeur afin de confirmer cette relation.

Différentes études ayant utilisé des outils moléculaires afin d'assurer le suivi du développement des bactéries nitrifiantes ont rapporté une hausse des NOB par rapport aux AOB. Ainsi, les travaux de Dionisi et al. (2002) portant sur une station d'épuration par boues activées ont rapporté un nombre 62 fois plus important de *Nitrospira sp.* (NOB) par rapport aux cellules *N-oligotropha* (AOB). Quant aux travaux de Shramm et al. (1999) portant sur un réacteur nitrifiant à lit fluidisé, la population d'AOB observée tendait à décroître en fonction de la profondeur tandis que la population des NOB s'accroissait. Les travaux de Gieseke et al. (2001) portaient sur l'évaluation de la population des nitrifiantes d'une biomasse en suspension dans un réacteur biologique séquentiel (RBS). Leurs observations rapportent une hausse des NOB dans le premier 100 µm du biofilm d'environ 30 fois supérieures à la population d'AOB. Ces différents travaux semblent identifier comme cause probable le temps de rétention hydraulique (HRT) ainsi que la charge C/N afin d'expliquer la domination des NOB au sein d'un biofilm nitrifiant fonctionnel.

1.6.4 La polyvalence du métabolisme des NOB

La polyvalence du métabolisme des NOB particulièrement associé aux *Nitrospira* a été considérée afin d'expliquer leur supériorité dans le biofilm nitrifiant. Ainsi, dès 1986, Watson et al. (1986), avec la découverte d'une nouvelle espèce de bactérie chemolithoautotrophe capable d'oxyder les nitrites, la *Nitrospira marina*, émettaient l'hypothèse que ce groupe de bactéries pourrait être l'une des populations de NOB dominante dans l'environnement. Depuis, avec le raffinement des études métaboliques et génétiques, il a été démontré, entre autres par Lucker et al. (2010), que les *Nitrospira* constituent un groupe de bactéries nitrifiantes diversifié et parmi les plus répandus dans les écosystèmes naturels ainsi que dans les procédés biologiques des eaux usées. Les travaux de Koch et al. (2015) ont quant à eux

mis en évidence une propriété métabolique inattendue chez les NOB du genre *Nitrospira moscoviensis*, une autre espèce répandue dans les eaux usées. Ces NOB ont un gène codant une uréase leur permettant ainsi de cliver l'urée présent en ammoniac. De ce fait, ces espèces ont la capacité d'alimenter en ammoniac les AOB responsables de la nitrification. Ainsi, Koch et al. (2015) proposent que cette alimentation réciproque avec les AOB et cette polyvalence métabolique puissent être des facteurs clés pouvant expliquer les observations sur l'ubiquité et la domination des NOB dans les systèmes naturels et les procédés de traitement biologique. Récemment, les travaux de recherche de Daims et al. (2015) ont mis en évidence la présence d'une espèce de *Nitrospira*, dont l'existence était autrefois hypothétique, capable d'accomplir le cycle complet de nitrification, soit les « comammox » (complete ammonia oxidizer). Le génome de cet organisme chemolithoautotrophe encode une voie métabolique à la fois pour l'oxydation de l'azote ammoniacal et des nitrites pouvant être activée en même temps pendant la croissance. Une telle capacité remet en question le cycle de l'azote tel qu'on le connaît et pourrait faire des comammox une espèce clé des procédés biologiques de traitement des eaux.

1.7 Positionnement de la recherche

Au regard de l'état de l'art dans le domaine de l'analyse des biomasses fixées, la présente recherche explore une nouvelle avenue analytique afin d'aider et de faciliter l'étude microbiologique d'un consortium de bactéries fixées d'un système d'épuration biologique. Les travaux réalisés visent à combler des lacunes de connaissances associées aux cultures fixées et à leur développement au fil de la filière de traitement. Les sections suivantes présentent d'abord la problématique de recherche, posent l'hypothèse de recherche afin de cadrer l'orientation de l'étude et énoncent un objectif général (assorti de trois sous-objectifs spécifiques) afin de répondre à l'hypothèse posée.

1.7.1 Problématique

En accord avec les réglementations canadiennes et québécoises pour l'enlèvement de l'azote ammoniacal ou la toxicité des effluents, les stations d'épurations se voient contraintes à

adapter leur filière de traitement afin de répondre aux exigences de rejets. Cette adaptation se résume la plupart du temps en un investissement substantiel pour l'acquisition de nouvelles unités de traitement pour l'enlèvement de l'azote ammoniacal. Or, ce n'est pas toutes les municipalités qui peuvent s'acquitter facilement de cette éventualité non seulement en regard du financement impliqué, mais également sur la faisabilité d'implanter sur l'espace disponible cette nouvelle filière de traitement. Un dilemme se pose alors pour les propriétaires ou exploitants des ouvrages municipaux d'assainissement : investir dans une nouvelle filière de traitement ou améliorer le traitement déjà en place. Le raisonnement n'est pas si simple pour les systèmes d'épuration biologique basés sur les cultures bactériennes fixées, car le manque d'information sur les capacités intrinsèques de tels systèmes voile le potentiel que celui-ci pourrait offrir. De plus, les techniques actuelles d'analyse des biofilms sont peu adaptées pour une application rapide de terrain et à bon prix. En effet, bien que les technologies développées en recherche fondamentale sur les biofilms sont à la fine pointe de leur art (et fournissent des réponses précises), les résultats analytiques obtenus ne permettent pas une application concrète à des fins opérationnelles afin d'en améliorer ou en optimiser le traitement. La concordance de ces renseignements reste à faire afin de corroborer l'état microbiologique à sa capacité de traitement. La relation n'est pas clairement établie pour les biomasses de type fixées et peu alors mener à de mauvaises prises de décisions d'un point de vue opérationnel.

1.7.2 Hypothèse de recherche

Afin de répondre à la problématique de recherche présentée portant essentiellement sur le manque d'informations relatives aux comportements d'un biofilm à biomasse fixée dans les ouvrages municipaux d'assainissement, la piste de réflexion suivante est proposée et conduira à l'hypothèse de recherche.

L'hypothèse proposée émerge de l'idée qu'il existe un état microbiologique (ou une synergie microbienne) en fonction d'une condition donnée environnementale et technique (caractéristiques d'eaux usées et conditions opérationnelles) et que la connaissance

de cet état permet d'orienter les prises de décision quant aux moyens à mettre en œuvre pour améliorer la performance des systèmes d'épuration en place (à base de cultures bactériennes fixées) et d'atteindre des objectifs de traitement spécifiques. L'hypothèse de recherche se définit comme suit :

L'observation de l'état microbiologique d'une culture bactérienne fixée associée à différentes conditions d'eau (DBO₅, azote ammoniacal, etc.) et à différentes conditions opérationnelles (oxygène dissous, débit, lavage des filtres) peut être reliée au rendement. Cette association repose sur le principe qu'une corrélation existe entre l'état microbiologique de la culture bactérienne fixée, les caractéristiques d'eaux usées, les conditions opérationnelles et les rendements d'une station d'épuration biologique. De l'état microbiologique d'un biofilm, il est possible d'orienter les conditions opérationnelles pour atteindre un nouvel état microbiologique qui tendra vers un rendement donné (ex. : pour le traitement de l'azote ammoniacal), et ce, dans toutes stations d'épuration ayant un procédé biologique à cultures bactériennes fixées, y compris celles qui ne seraient initialement pas conçues pour le traitement de l'azote ammoniacal.

1.7.3 Objectif général et objectifs spécifiques

Le présent projet de recherche a pour objectif général de définir le lien qui existe entre l'état des populations relatives des bactéries nitrifiantes présentes dans un biofilm (tel que celui existant sur les granules de schiste expansé d'un biofiltre Biocarbonate®), les caractéristiques d'eaux usées, les conditions opérationnelles ainsi que la capacité de traitement de la matière organique ou de l'azote ammoniacal d'un réacteur biologique à culture fixée. Cet objectif général se décline en trois sous-objectifs décrits ci-dessous.

Objectif 1. Déterminer l'effet des changements opérationnels concernant l'aération du biofiltre, la modification des paramètres de lavages ainsi que le débit présentent une incidence significative sur le développement des principaux groupes bactériens responsables

de la nitrification, et ce, en lien avec la population totale bactérienne et la profondeur du lit filtrant. Cet objectif est poursuivi à l'article scientifique 1 (chapitre 3).

Objectif 2. Corréler les développements significatifs des bactéries nitrifiantes au sein de la biomasse totale avec les paramètres de qualité d'eaux observés lors des différents essais de modifications opérationnels. Valider si l'augmentation de la population relative nitrifiante favorise le processus de nitrification et, par conséquent, l'enlèvement des autres paramètres de traitement. Cet objectif est poursuivi à l'article scientifique 2 (chapitre 4).

Objectif 3. Identifier les processus et les facteurs clés du système de biofiltration afin de favoriser le développement de la biomasse nitrifiante et la nitrification. Par la variation de ces paramètres, déterminer les différentes configurations que doivent prendre le système afin d'orienter le traitement vers les besoins particuliers des municipalités (ex. : enlèvement de l'azote ammoniacal). Cet objectif est poursuivi à l'article scientifique 3 (chapitre 5).

CHAPITRE 2

APPROCHE MÉTHODOLOGIQUE

Afin d'atteindre les objectifs de recherche, plusieurs approches analytiques ont été retenues : l'analyse par qPCR des consortiums bactériens AOB et NOB (principales constituantes d'une biomasse nitrifiante), l'analyse FISH sur les mêmes consortiums afin d'appuyer les résultats qPCR permettant de donner une indication sur la structure du biofilm ainsi qu'une analyse des paramètres d'eaux usées pouvant témoigner du rendement de la biofiltration. Comme les essais expérimentaux se sont déroulés en station d'épuration à pleine échelle, il convient de détailler le cadre d'étude et ses spécificités quant aux procédures d'échantillonnages. Toutefois, l'approche méthodologique physico-chimique et microbiologique respecte un cadre de référence pouvant être transposé à d'autres types de procédés biologiques de type à biomasse fixée.

2.1 Description détaillée de la station d'épuration d'Auteuil

Les essais expérimentaux ont été menés à la station d'épuration municipale d'Auteuil (Ville de Laval, Québec, Canada). Elle est basée sur un procédé de filtration biologique à contre-courant avec eau et air. L'apport moyen d'eaux usées (33 000 m³/d) est réparti de manière égale sur deux biofiltres submergés, aérobies, à courant descendant de type Biocarbonate® (OTV) (biomasse fixée, figure 2.1).

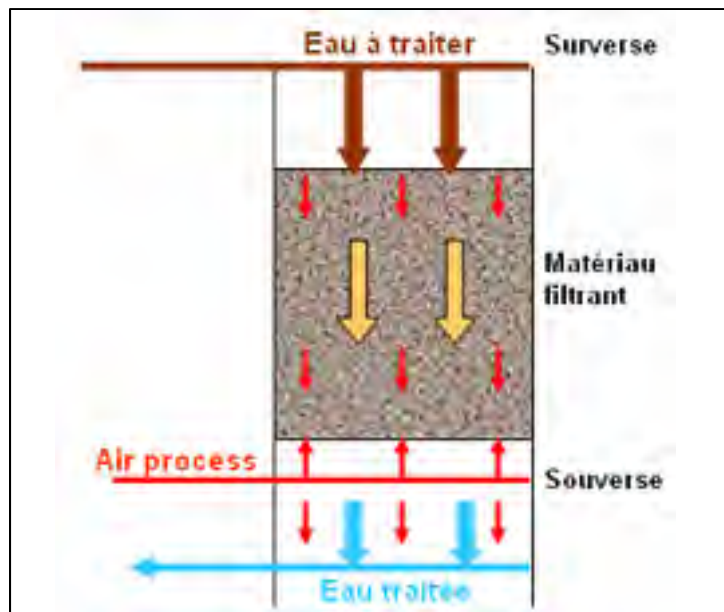


Figure 2.1 Vue en plan d'un traitement par biofiltration de type Biocarbone Tiré de Vigne (2007)

Comme le montre la figure 2.2, chaque biofiltre est composé de 10 cellules de traitement constituées d'une épaisseur de 1,8 m de « Biodagen » (schiste expansé granulaire avec un diamètre nominal de 3 à 6 mm). Chaque cellule de traitement d'un biofiltre s'ouvre (mode de filtration) ou se ferme (mode d'attente) en fonction du débit affluent et fonctionne en rotation. En mode filtration, et avec une cellule en lavage, la charge hydraulique superficielle prévue sur chaque lit de média (cellule de traitement) varie normalement de 4,8 à 9,4 m³/m²/h (temps de filtration de 22,5 et 11,5 min) avec un débit maximum d'entrée de 33 000 à 65 000 m³/d. Les données expérimentales montrent une charge hydraulique moyenne d'entrée de 7 m³/m²/h (temps de filtration de 15,4 min) pendant la durée de l'étude. Deux cellules côte-à-côte représentées en vert à la figure 2.2 ont été sélectionnées dans chaque biofiltre, à l'exclusion de celles qui étaient les plus proches du point d'entrée d'eaux usées.

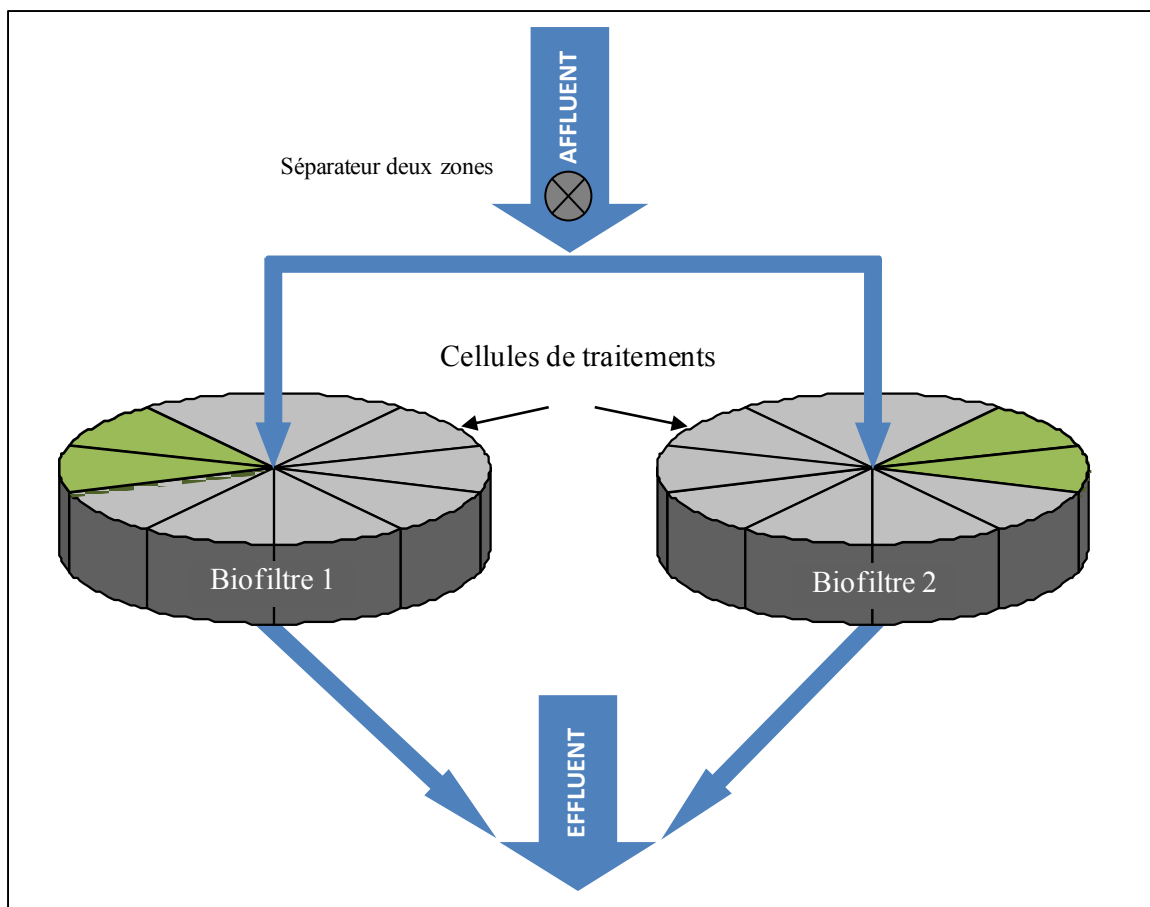


Figure 2.2 Configuration des biofiltres et des cellules de traitements à la station d'épuration d'Auteuil, Ville de Laval

Les eaux usées étaient principalement constituées d'eaux usées résidentielles (domestiques). La température moyenne de l'eau usée et le pH ont été respectivement de $18,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ et $6,8 \pm 0,3$ durant les périodes d'essais et d'échantillonnage. La station d'épuration n'était pas en mesure de maintenir une quelconque nitrification biologique avant le début de l'étude.

2.1.1 Description du cadre d'échantillonnage

Des échantillons de grains de schistes expansés ont été prélevés par carottage dans le massif filtrant. Comme décrites précédemment, deux cellules côte-à-côte ont été sélectionnées par biofiltre, à l'exclusion de celles qui étaient trop proches du point d'entrée de l'eau usée afin de réduire les variations de charge hydraulique engendrées par l'intensité du débit à ce point

particulier d'entrée. Les cellules sélectionnées étaient opposées symétriquement dans chaque biofiltre et avaient toutes une hauteur similaire de média filtrant. Les échantillonnages de grains de schistes ont été réalisés à quatre profondeurs dans le massif de schiste (figure 2.3), soit 1, 2, 4 et 5 pieds (0,3; 0,6; 1,2 et 1,5 m). Ils ont été effectués à l'aide d'une perche perforée pouvant s'ouvrir à la profondeur désirée pour ainsi récolter uniquement l'échantillon d'intérêt. Chaque échantillon de schiste prélevé a été conservé à -20°C dans un tube stérile de 50 mL contenant du glycérol en vue des analyses microbiologiques subséquentes.

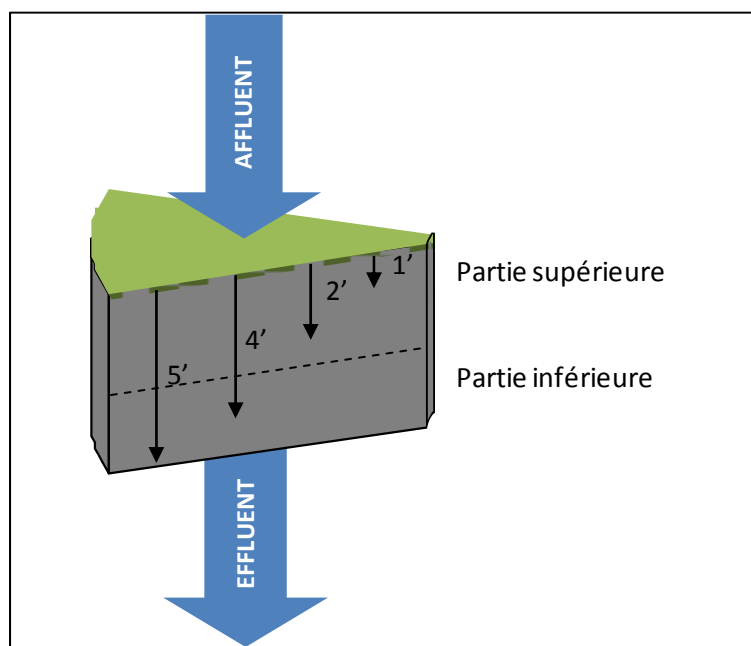


Figure 2.3 Vue en coupe d'une cellule de traitement ainsi que la hauteur des points d'échantillonnage pour le schiste et l'eau usée

Les eaux usées ont été échantillonnées à l'aide d'une pompe péristaltique Easy-load® (Masterflex®, modèle 7518-60) avec tube LS-15 Masterflex®, conformément aux méthodes d'échantillonnages du Centre d'expertise en analyse environnementale du ministère de l'Environnement du Québec (CEAEQ-MDDEFP). Le protocole impliquait un échantillonnage proportionnel au temps avec un taux de prise de volume d'un litre par heure pour un échantillon composé sur 14 heures. L'échantillon a été maintenu à 4°C dans une bouteille de polyéthylène. Les eaux usées ont été échantillonnées deux fois par semaine à

chaque profondeur d'échantillonnage tel que décrit précédemment ainsi qu'aux points affluent et effluent de la station. Les essais ont eu lieu en période estivale pendant cinq semaines sur trois années consécutives. Les paramètres physico-chimiques contrôlés pour le suivi des performances en station ont été analysés en accord avec les méthodes du manuel *Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Rice et al., 2012). Les analyses suivantes ont été réalisées : demande biochimique en oxygène (DBO_5), demande chimique en oxygène (DCO), alcalinité totale, azote ammoniacal ($\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$). Des analyses complémentaires de nitrite/nitrate ($\text{NO}_2/\text{NO}_3^-$) et d'azote total (Nt) ont également été effectuées en parallèle. Le tableau 2.1 résume les paramètres étudiés lors des essais ainsi que la fréquence de prélèvement des échantillons.

Tableau 2.1 Paramètres suivis et fréquences d'échantillonnage

Paramètres	Fréquence d'échantillonnage par semaine / point d'échantillonnage					Effluent
	Affluent	1'	2'	4'	5'	
DBO/DCO	3	2	2	2	2	3
O_2	3	2	2	2	2	3
NH_4^+	3	2	2	2	2	3
$\text{NO}_2/\text{NO}_3^-$	3	2	2	2	2	3
Nt	3	2	2	2	2	3
Alcalinité	2	2	2	2	2	2
pH	3	2	2	2	2	3
T°C	3	2	2	2	2	3
FISH*	-	2	2	2	2	-
qPCR	-	2	2	2	2	-

*Les échantillons ont été prélevés deux fois par semaine, en période estivale, pendant 5 semaine par essai. Les analyses FISH ont été effectuées sur une sélection d'échantillons représentatifs du développement des bactéries nitrifiantes. Ils ont ainsi été sélectionnés à la suite des analyses qPCR

Chacun des essais réalisés a conduit à l'obtention d'un nombre d'échantillons permettant une moyenne sur cinq semaines pour chaque paramètre analysé. Le tableau 2.2 résume l'ensemble du nombre d'échantillons d'eaux usées et de schiste récoltés pour le suivi des différents paramètres et du biofilm bactérien. Le débit affluent en eaux usées a également été mesuré

lors des essais pour chaque biofiltre. Ces données de débits ont ainsi permis d'évaluer la charge en nutriments et le taux de filtration. Les résultats ont ensuite été comparés au développement de la population bactérienne nitrifiante obtenue par les analyses microbiologiques.

2.2 Conditions d'essai

Cette section aborde les trois conditions d'essai mises en place à la station d'épuration d'Auteuil afin de valider expérimentalement les hypothèses de recherche. Ces conditions ont été établies en fonction des contraintes physiques au niveau opérationnel pour le procédé de biofiltration ainsi que du cadre théorique sur les potentiels effets que peuvent avoir ces conditions sur la biomasse. Dans certains cas, les essais ont été réalisés sur un biofiltre entier alors que le second a agi comme témoin (biofiltre de contrôle). Dans les autres cas, une cellule a été sélectionnée pour les essais alors que la cellule soeur (dans le même biofiltre) a agi comme témoin (cellule de contrôle). Pour chaque condition d'essai, une période de conditionnement minimale de cinq semaines a été respectée avant l'échantillonnage des eaux usées et du média filtrant.

Tableau 2.2 Paramètres suivis et nombre d'échantillons prélevés

Localisation	Type	Paramètres	Nombre d'échantillons ¹
Affluent de station	Aff _{total}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité, pH, Température, OD, Sulfures	45 _{total} /5 semaines
	Aff _{soluble}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité	45 _{soluble} /5 semaines
Affluent des biofiltres	Aff/bio _{total}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité, pH, Température, OD, Sulfures*	30 _{total} /5 semaines
	Aff/bio _{soluble}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité, Pt*	30 _{soluble} /5 semaines
Effluent biofiltres	Bio1/Bio2 _{total}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité, pH, Température, OD, Sulfures*	30 _{total} /5 semaines
	Bio1/Bio2 _{soluble}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité, Pt*	30 _{soluble} /5 semaines
Effluent de station	Eff _{total}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité, pH, Température, OD, Sulfures*	45 _{total} /5 semaines
	Eff _{soluble}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité	45 _{soluble} /5 semaines
Cellules de traitement			
1' profondeur	1' _{total}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité, pH, Température, OD, Sulfures*	30 _{total} /5 semaines
	1' _{soluble}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité	30 _{soluble} /5 semaines
2' profondeur	2' _{total}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité, pH, Température, OD, Sulfures*	30 _{total} /5 semaines
	2' _{soluble}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité	30 _{soluble} /5 semaines
4' profondeur	4' _{total}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité, pH, Température, OD, Sulfures*	30 _{total} /5 semaines
	4' _{soluble}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité	30 _{soluble} /5 semaines
5' profondeur	5' _{total}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité, pH, Température, OD, Sulfures*	30 _{total} /5 semaines
	5' _{soluble}	DBO ₅ , DCO, Nt, NH ₄ ⁺ -NH ₃ , NO ₂ ⁻ -NO ₃ ⁻ Alcalinité	30 _{soluble} /5 semaines
	Schiste ²	qPCR, FISH	160/5 semaines, 20
¹ L'échantillonnage est effectué en période estival lors de chaque essai se déroulant sur trois années consécutives. Le nombre d'échantillons analysés inclue les triplicatas sur chaque paramètre. ² Les échantillons de schistes ont été prélevés dans les cellules test et contrôle à toutes les profondeurs étudiées à raison d'un cumulatif de 160 échantillons prélevés pour les analyses par qPCR pour un total de 480 échantillons. 20 échantillons de schiste parmi les 480 ont été sélectionnés pour les analyses FISH. * Les analyses de sulfures et de phosphore total ont été effectuées uniquement lors des essais sur l'aération.			

2.2.1 Essai sur l'aération

L'objectif de cet essai consistait à étudier l'effet de l'aération soutenue sur la biomasse présente (dont celle nitrifiante) ainsi que sur sa résultante en traitement, en fonction de la profondeur du lit filtrant et en comparaison avec un témoin sans aération. Lors de cet essai,

les conditions aérobies ont été produites en injectant de l'air de procédé à raison de 3000 m³/h à contre-courant à travers le biofiltre d'essai, alors qu'aucun air de procédé n'a été injecté dans le biofiltre de contrôle.

2.2.2 Essai de modification de lavage à contre-courant

Cet essai avait pour objectif d'étudier l'effet de lavage à contre-courant sur le maintien et le développement de la biomasse (dont celle nitrifiante) dans un biofilm majoritairement hétérotrophe. En effet, considérant que le lavage à contre-courant a pour objectif de décolmater le filtre de tous les résidus accumulés ainsi que de l'excédent de biomasse, le lavage a été effectué à forte intensité par l'afflux d'eau et d'air. Cet essai permettait alors d'évaluer si un lavage à intensité réduite, mais plus fréquent pourrait favoriser le développement des bactéries à plus faible croissance, tel que les bactéries nitrifiantes, en épurant le biofilm de sa population hétérotrophe à forte croissance. Les paramètres modifiés de lavage à contre-courant pour les cellules testées ont été les suivants : procédure de décolmatage pendant 2 minutes avec une injection d'air seul, puis lavage à contre-courant (air et eau) pendant 6 min suivies d'eau seule pendant 1 min, pour un lavage d'une durée totale de 9 min. La durée de filtration entre les rinçages a été réduite de 16 à 12 heures. Le biofiltre de contrôle a suivi la même procédure sauf que le lavage à contre-courant a duré 11 minutes au lieu de 6 minutes, tandis que la durée de filtration entre les lavages à contre-courant a été fixée à 16 heures. La rotation des cellules en attente du filtre Biocarbonate® a été fixée à 30 min dans les cellules test et de contrôle. De plus, l'air de procédé a été maintenu à un débit de 3000 m³/h.

2.2.3 Essai sur l'ajustement du débit

Cet essai avait pour objectif d'observer le comportement de la biomasse nitrifiante lorsque le débit affluent d'eaux usées est réduit. Cette action avait comme conséquence directe de réduire la charge superficielle en nutriments, mais aussi d'augmenter le temps de contact de l'eau avec la biomasse. Ainsi, l'ouverture contrôlant le débit affluent des eaux usées sur les cellules de traitement a été limitée à 2,3 m² (test) au lieu de 10,1 m² (contrôle). Il convient de

noter que l'afflux d'eaux usées atteint rarement le niveau maximum. Cette restriction a provoqué une réduction moyenne de 36 % du débit normal d'eaux usées et une durée moyenne de filtration de 21 min (les cellules témoins n'avaient aucune restriction et présentaient un temps de filtration moyen de 15,4 min). Tout comme pour les essais d'aération et de modification de lavage à contre-courant, le débit d'air de procédé a été maintenu à 3000 m³/h.

2.3 Analyse microbiologique

Afin d'étudier la présence relative des bactéries AOB et NOB dans le biofilm, des analyses microbiologiques portant sur des gènes spécifiques à ces groupes bactériens ont été effectuées. L'analyse de la réaction en chaîne par la polymérase (PCR) permet de détecter par amplification une infime portion de gènes présents dans l'échantillon. Cet essai se base sur la capacité de l'enzyme polymérase à synthétiser l'ADN et par l'utilisation de sonde génétique (séquence d'oligonucléotides spécifique) qui, en se fixant sur les séquences d'ADN ciblées, guide le travail de la polymérase. La qPCR ou la PCR quantitative permettent de suivre en temps réel l'évolution de l'amplification de l'ADN et l'apparition du seuil quantifiable qui est proportionnelle à la quantité d'ADN initiale dans l'échantillon. Ainsi, il est possible de quantifier avec précision le nombre de copies du gène d'intérêt qu'il y a dans l'échantillon de départ ou d'évaluer la présence relative de l'organisme étudié parmi l'ensemble d'ADN recueilli.

L'observation au microscope confocale pour faire suite au test de fluorescence par hybridation *in situ* (FISH) permet par l'utilisation de sonde d'oligonucléotides spécifique aux espèces bactériennes étudiées d'observer la structure et l'organisation de ses microorganismes au sein du biofilm. Cette analyse peut également être utilisée à des fins de quantification. Cette section décrit donc en détail les différentes analyses réalisées sur le biofilm.

2.3.1 Extraction d'ADN

Afin de procéder aux analyses de qPCR, il est nécessaire d'extraire l'ADN contenu dans tout le biofilm présent sur le grain de schiste. Ainsi, les bactéries et la majeure partie du matériel biologique ont été extraites des grains de schiste expansé du biofilm par une méthode mécanique vigoureuse en accord avec la méthode d'extraction proposée par Blanco (2010), en présence de tampon phosphate (PBS). L'ADN génomique a ensuite été extrait de la mixture provenant du biofilm en utilisant un kit d'extraction d'acide nucléique (kit de purification d'ADN génomique Wizard, Promega, Madison, WI), selon les instructions du fabricant. Chaque échantillon a été élué dans une solution de réhydratation d'ADN avant d'être dilué (100 à 1000 fois) avec de l'eau purifiée et stocké à -20°C. Les concentrations d'ADN initiales ont été quantifiées à l'aide du kit de test Quant-iT™, PicoGreen®, dsDNA (ThermoScientific, Burlington, ON) (Ahn, Costa & Rettig, 1996). L'ADN génomique des cellules de traitement test et de contrôle (témoin) a été isolé à partir d'échantillons prélevés aux différentes profondeurs dans le massif filtrant.

2.3.2 Analyse qPCR sur le gène ARNr-16S

Afin d'évaluer l'abondance relative des populations microbiennes sur le biofilm, une évaluation de l'ensemble des espèces par la détection du gène ARNr-16S a été réalisée. L'approche par amorces dégénérées a été utilisée pour évaluer cette population. L'utilisation de la qPCR, en raison de la rapidité des cycles d'amplification, oblige la sélection d'une portion d'ADN beaucoup plus courte (environ 150 paires de bases au lieu de grande séquence de 400 bp et plus) à amplifier. C'est donc pourquoi de nouvelles sondes pour le gène ARNr-16S ont été développées dans le cadre de la présente thèse afin de réaliser un dépistage général des bactéries les plus communes trouvées dans les eaux usées. Les données permettant d'estimer la présence relative des bactéries totales dans le biofilm donnent une idée sur le développement du biofilm bactérien en général. Celui-ci peut avoir un impact sur la sous-population de bactéries nitrifiantes qui se développe généralement moins rapidement que la grande majorité des microorganismes constituant le biofilm.

2.3.3 Amplification du gène *amoA* et *nxrB*

Les gènes *amoA* et *nxrB* sont des gènes codant une sous-unité de l'enzyme spécifique aux consortiums de bactéries impliqués dans la nitrification. Le gène *amoA* code la sous-unité A de l'enzyme (ammonia monooxygenase) oxydant l'ammoniac (NH_3) présente chez les AOA et AOB. Le gène *nxrB* code quant à lui la sous-unité B de l'enzyme (nitrite oxydoreductase) oxydant les nitrites (NO_2^-) en nitrate (NO_3^-) présente chez les NOB. Ainsi, afin d'estimer la présence relative des populations d'AOB et de NOB dans le biofilm extrait, il faut d'abord sélectionner la portion de gènes qui sera spécifique pour une large sélection de microorganismes. Pour ce faire, la séquence partielle des gènes *amoA* (AOB) et *nxrB* (NOB), à partir d'une sélection représentative des principales espèces d'AOB et de NOB répertoriées dans les ouvrages municipaux d'assainissement (ANNEXE I) ont été alignés à l'aide du logiciel ClustalW2 (European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridgeshire, Royaume-Uni). Les amorces dégénérées ont alors été construites à partir de cet alignement de séquence génétique. Elles sont dégénérées puisque là où les séquences génétiques se sont différenciées parmi les différentes espèces d'une même famille, l'amorce doit inclure des bases dégénérées afin d'élargir son rayon d'action et ainsi pouvoir détecter le maximum d'espèces différentes possédant le gène étudié. Il est considéré selon les études de Graham et al. (2007) que les populations d'AOA sont négligeables dans les biofilms en eaux usées et que les espèces *Nitrosomonas* spp. et *Nitrospira* spp. sont considérées comme les principales espèces d'AOB et de NOB dans les échantillons d'eaux usées (Wen-Tso Liu, 2010). Ainsi, les amorces dégénérées (présentées au Chapitre 3) ont été conçues pour obtenir un large spectre de populations AOB et NOB. Les analyses de qPCR ont été effectuées en utilisant des plaques à 96 puits (Eppendorf, Mississauga, ON) et le kit Perfecta® SYBR®Green FastMix® (Quanta, Beverly, MA) selon les instructions du fabricant. Les essais d'amplifications d'ADN par qPCR pour le gène *amoA* ont été effectués en utilisant 40 cycles de dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes, une dénaturation à 95°C pendant 10 s, une hybridation à 46,6°C pendant 30 s et une période d'élongation à 72°C pendant 10 s. Les essais d'amplifications de *nxrB* ont été effectués en utilisant 40 cycles de dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes, une dénaturation à 95°C pendant 10 s, une hybridation à 59,3°C pendant 30 s et

élongation à 72°C pendant 10 s. Afin de comparer les résultats obtenus avec un contrôle positif, un échantillon enrichi d'un biofilm nitrifiant issu d'un procédé de nitrification à l'échelle pilote (laboratoire STEPPE, École de technologie supérieure) a été utilisé.

2.3.4 Analyse de fluorescence par hybridation *in situ* (FISH)

L'analyse FISH est une analyse précise de marquage cellulaire et permet, entre autres, de réaliser un décompte bactérien direct. De plus, lors de l'étude d'un biofilm à biomasse fixée, cet outil, couplé à l'imagerie confocale, permet également de visualiser la distribution spatiale des microorganismes observés au sein de la structure du biofilm. Ce renseignement indique alors à quelle profondeur du biofilm les bactéries se développent. Cependant, l'étude de la structure du biofilm requiert le moins d'altérations possible sur celui-ci. Dans le cas présent, le biofilm croissant sur un grain de schiste, la visualisation par microscopie confocale, quoique possible, a présenté ses limites. L'observation à fort grossissement pour le décompte direct des microorganismes est donc impossible, due à la forme sphérique et irrégulière du support de croissance. D'autres stratégies d'estimation de la population par analyse FISH sont alors présentées dans cette section.

Afin de visualiser la distribution spatiale de la communauté nitrifiante et de confirmer l'analyse qPCR avec la même approche expérimentale, des alignements multiples d'une région partielle du gène ARNr-16S de plusieurs espèces d'AOB et de NOB sélectionnées pour cette étude (ANNEXE I) ont été réalisés à l'aide de l'outil d'alignement ClustalW2 (European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridgeshire, Royaume-Uni). Des oligonucléotides de 20 et 21 pb ont été conçus. Les extrémités 5' des oligonucléotides ont été couplées soit avec un fluorochrome ATTO 647 pour la détection des AOB (AOBs, 5' - /ATTO647NN/AGG TGC TGC ATG GCT GTC GT), soit avec un fluorochrome ATTO 488 pour la détection des NOB (NOBs; 5' - /ATTO488N/AGC GGT GGA GCA TGT GGT TTA). Ces analyses étant particulièrement sensibles, chacun de ces oligonucléotides a été testé à l'aide du contrôle positif provenant d'un biofilm nitrifiant tel que mentionné précédemment et d'une suspension de bactéries hétérotrophes (ThermoScientific) comme

contrôle négatif (non nitrifiant). Enfin, un grain de schiste sans coloration a été utilisé pour visualiser si l'échantillon produit une autofluorescence et la présence des micro-organismes a également été vérifiée avec la coloration de Hoechst sur chaque échantillon (Monger & Landry, 1993). Cette coloration permet la visualisation de l'ADN de tous les microorganismes présents dans le biofilm. Le biofilm lui-même a été coloré avec de l'agglutinine de germe de blé (WGA) couplée à un fluorochrome ATTO 555 afin de visualiser les structures et les biopolymères polysaccharidiques sécrétés par les microorganismes.

Chaque test a été effectué directement sur les grains de schiste en minimisant son altération. Chaque grain a été lavé à trois reprises dans du tampon phosphate PBS et fixé avec du paraformaldéhyde froid (4 %). L'hybridation a été réalisée comme décrite par Manz et al. (1992). La formamide a été ajoutée pour assurer une astringence d'hybridation optimale : les grains de schiste ont été complètement recouverts de tampon d'hybridation [500 μ L; NaCl 0,9 M, Tris 0,02 M (pH 7,5), SDS 0,01 %, formamide 20 %]. Dans une première étape, les amorces (ATTO 647) pour la détection des AOB ont été ajoutées avec le tampon d'hybridation et incubées pendant 4 à 18 heures à 58°C. Les grains ont ensuite été lavés dans un second tampon [NaCl 0,9 M, Tris 0,02 M (pH 7,5), 0,01 % SDS, 20 % formamide] pendant 15 min à 48°C. Ensuite, le grain de schiste a été incubé avec les amorces (ATTO 488) pour la détection des NOB, pendant 4 à 18 heures à 55°C. Par la suite, les grains de schiste ont été délicatement lavés dans un tampon de lavage et dans un second tampon [NaCl 0,9 M, Tris 0,02 M (pH 7,5), SDS 0,01 %] pendant 15 minutes à 48°C. Dans une dernière étape, du WGA 555 à raison de 5 μ g/mL a été ajouté avec un volume suffisant pour couvrir les grains et incubé pendant 10 min à température ambiante. Les grains de schiste ont ensuite été lavés dans un tampon PBS et analysés dans les 24 heures par microscopie confocale. L'acquisition des données a été réalisée avec un microscope confocal Zeiss LSM780 équipé du logiciel Zen (version 2011; Zeiss, Hambourg, Allemagne). À l'aide de l'imagerie 3D, l'intensité de l'émission fluorescente et le volume de l'échantillon (épaisseur x surfaces observées) ont été mesurés. Cette technique utilise le rapport intensité/volume, analogue au quotient de corrélation d'intensité (ICQ) (Li et al., 2004). Elle s'avère une

alternative efficace pour évaluer la présence des microorganismes ciblés sur un échantillon où la quantification directe est impossible, ce qui est le cas avec le grain de schiste en raison de l'impossibilité d'observer à fort grossissement l'échantillon. Les résultats sont ensuite comparés aux analyses qPCR en tant que deuxième observation du développement du biofilm nitrifiant.

2.4 Analyse des données

Chaque groupe de données recueillies par les analyses qPCR, FISH, ou celles des paramètres de qualité d'eau lors des essais opérationnels testés, a fait l'objet d'une analyse détaillée en fonction des objectifs à atteindre afin de répondre à la problématique soulevée dans la présente thèse. Ces analyses ont été considérées à différent niveau d'interprétation et elles réfèrent à un article spécifique.

2.4.1 Évaluation du développement des AOB et NOB relatif à la population totale bactérienne (Article 1)

Les données qPCR de l'amplification du gène ARNr-16S ont été calculées en fonction de la quantité totale d'ADN. De cette manière, pour chaque échantillon, une population bactérienne relative est exprimée en pourcentage de l'ADN global extrait. Le même exercice a été réalisé avec les résultats de qPCR sur les gènes *amoA* et *nxrB* avec seules différences que chaque échantillon donne un résultat exprimé en pourcentage d'AOB et NOB relatif à la présence moyenne de bactéries (résultats de l'analyse sur l'ARNr-16S) dans le biofilm. Cela permet de mettre en évidence le développement de la population nitrifiante par rapport à la biomasse bactérienne. Ainsi, ce type d'analyse ne réfèrera pas à la croissance proprement dite, mais à la présence de bactéries nitrifiantes. En effet, si la présence des bactéries nitrifiantes augmente par rapport à l'ensemble des bactéries, cela peut effectivement signifier une croissance de celles-ci, mais également une diminution de la population bactérienne hétérotrophe (principales bactéries constituant le biofilm) dans son ensemble.

Pour ce faire, tous les résultats Cq (seuil de détection) fournis par l'analyse qPCR ont été convertis en un équivalent d'unité bactérienne en utilisant une moyenne du nombre initial de copies du gène ciblé par génome et une moyenne de la masse du génome bactérien. L'analyse FISH est présentée afin d'appuyer par une seconde approche les résultats obtenus par qPCR ainsi que pour démontrer où se situent principalement ces bactéries dans la structure du biofilm.

2.4.2 Évaluation du développement des AOB et NOB relative à la biomasse totale du biofilm et corrélation au niveau du traitement d'eau (Article 2)

Cette méthode est similaire à celle présentée dans l'Article 1 avec la différence que les populations relatives d'AOB (*amoA*) et de NOB (*nxrB*) détectées dans les échantillons ont été calculées par rapport à l'ADN génomique total recueilli dans l'échantillon de biofilm en accord avec l'approche proposée dans des études antérieures (Dionisi et al., 2002a; Dionisi et al., 2002b; Dryburgh, 2011; Gruber-Dorninger et al., 2015; Pester et al., 2014). Il est ainsi possible d'observer d'un point de vue macroscopique le développement de la biomasse nitrifiante dans le biofilm. Ces données sont ensuite comparées avec les résultats de traitement d'eaux usées afin de mettre en exergue la relation entre le développement de la flore bactérienne nitrifiante au sein d'un biofilm de type biomasse fixée et l'efficacité du traitement obtenue.

2.4.3 Évaluation de l'efficacité de l'approche opérationnelle en vue de favoriser la nitrification dans un procédé biologique (Article 3)

La méthode employée se veut une description de l'implication opérationnelle (coût estimé) des modifications apportées sur la biofiltration afin d'améliorer la qualité du traitement par nitrification biologique. L'approche est fondée sur les principales observations du développement de la biomasse nitrifiante des Articles 1 et 2. Ainsi, en plus des paramètres courants analysés (DBO₅, DCO, alcalinité totale, azote ammoniacal), des analyses complémentaires de nitrite/nitrate (NO₂/NO₃⁻), d'azote total (Nt), de sulfures, de pH et d'oxygène dissous ont été réalisées. Une synthèse de l'amélioration au niveau du traitement

pour chacun des paramètres étudiés a ainsi pu être présentée, puis interprétée. L'objectif consiste à cibler les modifications à prioriser pour augmenter l'action des bactéries nitrifiantes, d'évaluer la viabilité d'une telle approche et d'aider à la prise de décision quant aux actions à prendre pour les exploitants des ouvrages municipaux d'assainissement de type biomasse fixée.

CHAPITRE 3

ARTICLE 1: OPERATIONAL MODIFICATIONS TO PROMOTE THE DEVELOPMENT OF NITRIFYING BIOMASS IN A NON NITRIFYING BIOLOGICAL AERATED FILTER: ASSESSMENT WITH DEGENERATED QPCR PRIMERS

François-René Bourgeois¹, Frédéric Monette^{1*}, Louisa Sades¹, Daniel G. Cyr²

¹Département de génie de la construction, STEPPE – Station Expérimentale des Procédés Pilotes en Environnement, École de technologie supérieure – Université du Québec
1100 Notre-Dame Street West, Montréal (Québec), Canada H3C 1K3

²Laboratoire de toxicologie environnementale, INRS-Institut Armand-Frappier – Université du Québec, 531, boulevard des Prairies, Laval (Québec), Canada H7V 1B7

Soumis pour publication le 6 avril 2018 au journal *Water Research*

3.1 Abstract

Biological wastewater treatment requires a stringent control in order to operate properly. Combined to the fact that nitrification is known for not being so easy to handle. With more stringent mandatory norms to reduce the N-NH₃ in wastewater, the need to obtain realistic information on how the nitrifying biofilm develops within the harsh conditions of the daily changing wastewater inflow and characteristics is necessary. In order to assess the development of the relative presence of ammonia oxidizing bacteria (AOB) and nitrite oxidizing bacteria (NOB) in an non-nitrifying attached growth biofilm from full scale biofiltration Biocarbhone[®] wastewater treatment plant (WWTP), qPCR assay on *amoA* and *nxrB* gene with degenerate primers have been done under different operational conditions: *Aeration* in biofilter, *Backwash modification* and *Inflow adjustment* in treatment cells. Visualisation of nitrifying clusters in the biofilm and confirmation assay for qPCR analysis were done with *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH) analysis. The development of the nitrifying biofilm was examined at four different depth levels, specifically at 1, 2, 4 and 5 feet depth. The cell was divided in two parts (upper part, lower part) in the biological filter. Testing conditions promoted the development of AOB and NOB mainly in the lower part of

the cell. The relative presence of AOB in the *Aeration* conditions reached 0.50 % in the test cell and 0.074 % in the control cell. In the *Modified backwash* conditions, values of 0.21 % and 0.11 % were obtained for both the test and the control cell and the *Inflow adjustment* conditions showed values of 0.58 and 0.19 %. Relative presence of NOB was also observed with values of 0.033 and 0.005 % for the test and the control cell in the *Aeration* condition, 0.046 and 0.006 % for the test and control cell in the *Modified backwash* and, unexpectedly, the *Inflow adjustment* condition had a significant effect on the development of the NOB as they became more present than the AOB with values of 6.3 % in the test cell. FISH results are in agreement with those obtained by qPCR. Distinct aggregates of AOB and NOB were observed in the biofilm mainly at the first 40 μm of the matrix. No degenerated primers have been developed previously for specific analysis of nitrifying bacteria in a full scale BAF and these results have an important impact on attached growth biofilm technologies as they provide a potential path of operational modifications for the purpose of reaching mandatory objectives at low-cost.

Key words: attached growth process, AOB, NOB, nitrification, qPCR, wastewater, operational parameters.

3.2 Introduction

As a result of its aquatic toxicity, the release of ammonia (N-NH_3) in wastewater effluents is regulated (Driscoll et al., 2003; Satin Marc, 2006), particularly in Canada where it is mandatory for wastewater treatment plants (WWTPs) to reduce the N-NH_3 concentrations to at least 1.25 $\text{mg-N-NH}_3/\text{L}$ at $15 \pm 1^\circ\text{C}$ in the effluents (Environment Canada, 2012). Nitrification has been widely studied over the past decade and has been used in numerous biological treatment systems (Environnement Canada, 2003; Daims & Wagner, 2010): suspended growth, attached growth and hybrid systems. Attached growth biofilms are the most common microbial growth within the environment (Jefferson, 2004), but suspended growth is the predominant biological process used around the world (Benidickson, 2011). Suspended growth process like activated sludge, respond well to mathematical model partly

because of the homogeneity of bacteria concentration within the reactor (Henze, 2000; Metcalf & Eddy, 2014). However, attached growth processes have had a resurgence in interest recently as they have proved to be more resistant and resilient when they face environmental stresses such as a toxic shock or the variation of nutrient availability (Chen et al., 2006; Metcalf & Eddy, 2014). This type of biomass do not risk to be washed out (Morgenroth & Wilderer, 2000) and may generate excellent nitrification rates (Chen et al., 2006). Attached growth biofilms, used in biological aerated filter (BAF), do not have a homogeneous bacterial concentration. It changes rather from top to bottom of the treatment cell and over the thickness of the biofilm itself. It also displays a strong correlation with the changes of physico-chemical characteristics in the wastewater that crosses the media bed (Vanhooren, 2002). This makes it difficult to understand the internal microbial mechanisms or interaction responsible for the wastewater treatment such as nitrification (Devinny & Ramesh, 2005). Analyses on the development of nitrifying bacterial populations in fixed biomasses are complex because of the structure of the biofilm itself and the heterogeneity of the microbial species composing it (Edwards, 1999; Lazarova & Manem, 1995; Wimpenny et al., 2000). The qPCR analysis approach with degenerate primers is a simple, effective and inexpensive way to get a general idea about the development of attached growth nitrifying biofilm. Among other things, this approach makes it possible to observe changes in the relative presence of these groups of bacteria, whereas the traditional highly targeted methods may not notice them.

Nitrification is a chemolithotrophic two-step biochemical process. The reaction is attributed to distinct groups of microorganisms frequently seen in WWTPs: ammonia-oxidizing bacteria (AOB) belonging to the β - and γ - *Proteobacteria*; nitrite-oxidizing bacteria (NOB); and ammonia-oxidizing archaea (AOA); (Lavergne, 2014; Stahl & Torre, 2012; Teske et al., 1994). AOB and NOB are known to dominate the nitrifier group (Foesel et al., 2008; Kindaichi et al., 2006; Li et al., 2015). The AOB are most commonly associated with the *Nitrosomonas* spp. in biofilm (Foesel et al., 2008) and are responsible for the oxidation of NH_4^+ to NO_2^- , in the sequential transformation of NH_4^+ to hydroxylamine (NH_2OH) by ammonia monooxygenase (McTavish et al., 1993), and subsequently to NO_2^- by

hydroxylamine dehydrogenase (Sayavedra-Soto, Hommes & Arp, 1994). *amoA* gene encodes the catalytic α -subunit of ammonia monooxygenase. Because this gene is well conserved and is required by all AOB and also because some archaea carry an *amoA* (Schleper et al., 2005), it has been used as a molecular marker for studies of the AOB and AOA communities. NO_2^- is then oxidised by the NOB to form NO_3^- by means of the enzyme nitrite oxidoreductase (Meincke et al., 1992). Nitrobacteria was considered as the predominant NOB in the soil and in wastewater. However, recent data suggests that it is in fact *Nitrospira* that forms the main population of NOB in wastewater (Blackburne et al., 2007; Foesel et al., 2008; Juretschko et al., 1998; Nogueira & Melo, 2006; Schramm et al., 1998; Yao & Peng, 2017). NOB include recently discovered *Nitrospira* bacteria (comammox) that can completely oxidize ammonia (Daims et al., 2015). It can then play a major role in nitrifying communities. *nxrB* gene encodes the catalytic beta subunit of nitrite oxidoreductase. This gene is required for all NOB and is used as a molecular marker for studies of NOB communities.

In order to have a better idea of the development of the nitrifying biomass, quantitative molecular techniques, such as PCR, qPCR or fluorescent *in situ* hybridization (FISH) have been used to qualify the microbial matrix using specific gene or species of interest within the population structure (Lazarova & Manem, 1995). These techniques work best on pure cultures and remain challenging with environmental samples due to the small quantities of templates in complex biological backgrounds and potential inhibitory effects from compounds that can interfere with the isolation of nucleic acids (Chandler, 1998). Working with attached growth biofilms from wastewater treatment plants is indicative of such difficulties. New approaches are needed in selecting primers for PCR or FISH analysis to overcome these limitations. In order to have a fast and reliable global representation of a microbial population, the approach with degenerated primers must be considered as an adaptation to the specific characteristics of the heterogenic attached growth biofilm.

This work presents a variation of molecular tools to be used with heterogenic attached growth biofilm in the nitrification area, by using qPCR with degenerate primers and confocal microscopy (FISH). The information obtained seeks to give a realistic input of how the

biofilm reacts within the harsh conditions of the daily changing wastewater inflow and characteristics. No degenerated primers has been developed previously for specific analysis of nitrifying bacteria in a full scale BAF.

The goal of this research was to capture a broad spectrum of nitrifying bacterial species (AOB and NOB) within an attached growth biomass, hereby on expanded schist grains, in a non-nitrifying BAF in a municipal WWTP. Design of degenerate qPCR primers will characterize the indigenous ammonia-oxidizing and nitrite-oxidizing populations and show their promoted development by operational modifications over the media bed.

3.3 Material and Methods

3.3.1 WWTP description and wastewater characteristics

A municipal wastewater treatment plant (WWTP; Auteuil Laval, Quebec, Canada) based on a biological filter process was used for these studies. The mean inflow of wastewater (33 000 m³/d) is distributed equally on two separate down-flow aerobic biofilters using a Biocarbon® (OTV) submerged biofilter (attached growth). As shown in Figures 3.1-A and B, each biofilter is composed of 10 process cells filled with 1.8 m of “Biodagen” (grain-sized expanded schist with a nominal diameter of 3-6 mm). Figure 3.1 (B) present a plan view of a treatment cell with site location (cross) of sampling devices (grain sized schist and wastewater). Only one treatment cell is shown but the setup is the same for all four selected treatment cells.

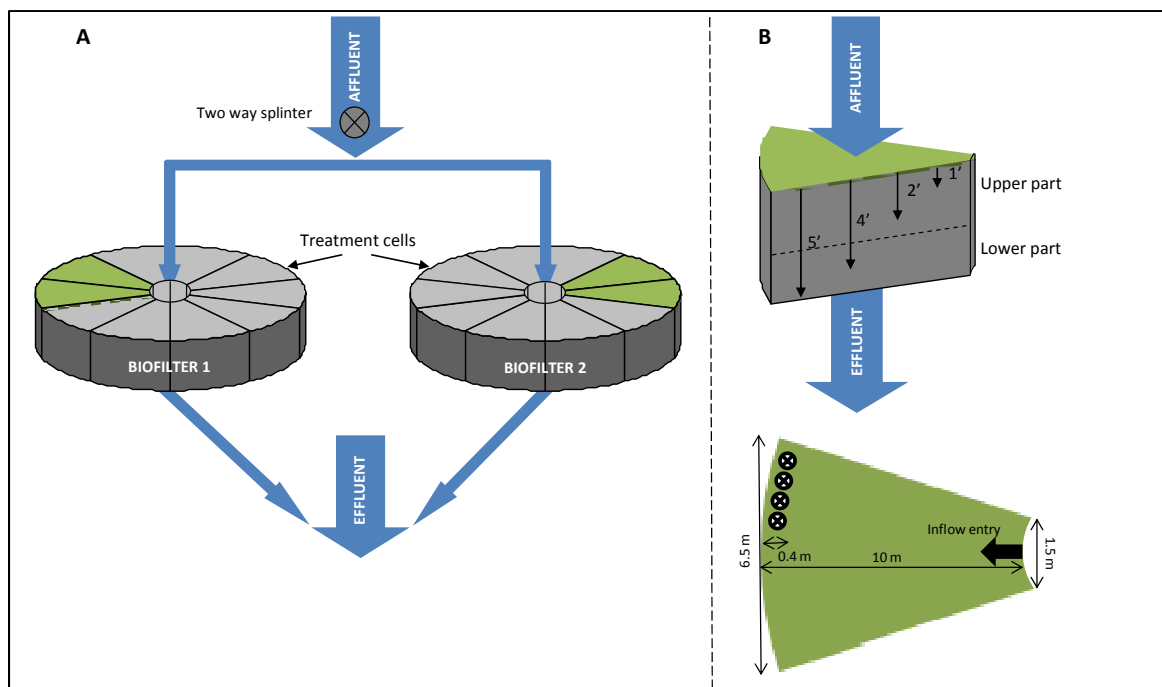


Figure 3.1 Detailed plan of (A), biofilters with treatment cell (gray) and selected test cell (green) and water distribution and (B), sectional view of a media bed with each depth, as used in the current study

Each treatment cell opens (filtration mode) or closes (waiting mode) depending on the inflow level and is operated in rotation within the biofilter. In filtration mode, and with one cell in backwashing, the designed hydraulic surface load on each media bed (treatment cell) is assumed to vary on average from 4.8 to 9.4 m³/m²/h (filtration time of 22.5 and 11.5 min) with maximum inflow of between 33 000 and 65 000 m³/d. Experimental data shows an average inflow hydraulic surface load of 7 m³/m²/h (filtration time of 15.4 min) during the study. Two side-by-side cells (shown in green in Figure 3.1) were selected from each biofilter, excluding those that were the closest to the entry inflow point. The wastewater consisted mainly of residential (domestic) sewage. This WWTP was not able to sustain nitrification prior to the beginning of the study and the bioreactors had an average wastewater temperature of $18.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ and were operated at a pH of 6.8 ± 0.3 during the sampling periods.

3.3.2 Test conditions

Three different operational conditions were assessed over a three years testing period: **1. Aerobic conditions** in which 3000 m³/h of processed air was injected through the test biofilter, whereas in control biofilter, no processed air was injected; **2. Modified backwash parameters**. Modified backwash parameters for the cells in the test biofilters were as followed: Unclogged procedure for 2 min with an air injection alone, followed by backwash and water rinse for 6 min and then water alone for 1 min (9 min); filtration time between backwashes was 12 hrs. Control biofilters followed the same procedure except that the backwash lasted 11 min (instead of 6 min) and filtration time between backwashes was 16 hrs. The rotation of waiting cells of a Biocarbon® filter was set at 30 min in both the test and control cells; **3. Inflow adjustment**. The inflow was restricted to 2.3 m² (test) instead of 10.1 m² (control). It should be noted that the wastewater inflow was rarely at maximum levels. This restriction caused an average reduction of 36 % of the normal wastewater inflow and an average filtration time of 21 min (controls had no restriction and displayed an average filtration time of 15.4 min). It is also worth mentioning that the nutrient load was obviously reduced under the restricted conditions. Also, processed air was maintained at 3000 m³/h for the modified backwash and inflow tests.

The processed cells of the biofilters were selected in order to observe changes in microbial communities within the biofilters and to define the operational parameters that have the most impact on the nitrifying bacterial populations. **Aerobic conditions** and **Modified backwash parameters** compared results from one biofilter (test) to the other (control) while **Inflow adjustment** compared a process cell (test) with an adjacent cell (control). For each test condition, a minimum conditioning period of 5 weeks was allowed before schist grain or wastewater sampling.

3.3.3 Samples

Samples of expanded schist grain were taken by core sampling in the media bed (Figure 3.2). Each sampling point was done at 4 different depths over the schist bed (Figure 1-B): 1, 2, 4,

and 5 feet (0.3, 0.6, 1.2 and 1.5 m). Each schist sample was preserved at -20°C in a sterile 50 mL tube containing glycerol for microbiological analysis.

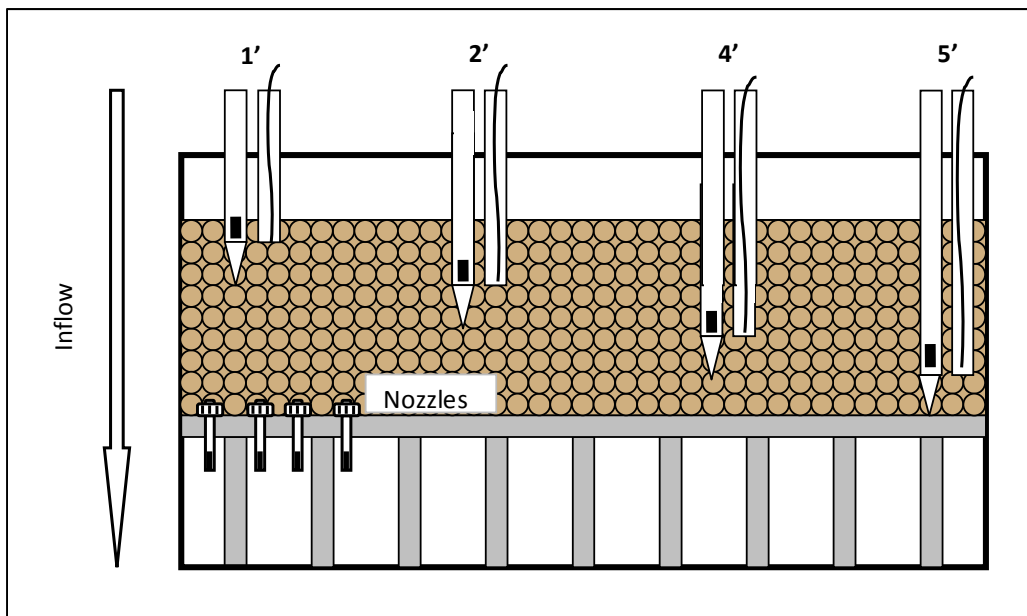


Figure 3.2 Sectional view of a treatment cell with grain and wastewater sampler device

3.3.4 Biofilm analysis

3.3.4.1 DNA extraction

Bacterias and most of the biological material were extracted from expanded schist grains of the biofilm by vigorously shaking 6 grains of similar size in the PBS buffer (10 mL) for 3 min, followed by washing in PBS buffer (5-10 mL; three times). Genomic DNA was then extracted from 1.7 mL of biofilm mixture using a nucleic acid extraction kit (*Wizard Genomic DNA purification kit*, Promega, Madison, WI), according to the manufacturer's instructions. Each sample was eluted in a DNA rehydration solution prior to being diluted (100-1000 fold) with distilled water and stored at -20°C. DNA levels were quantified using the Quant-iT™, PicoGreen®, dsDNA test kit (ThermoScientific, Burlington, ON) (Ahn et

al., 1996). Genomic DNA was isolated from expanded schist samples obtained at various depths of the process cells.

3.3.4.2 qPCR 16S-rRNA

In order to assess the relative abundance of the microbial populations on biofilm, an evaluation of the total microbial species within the biofilm has been done. The approach with degenerated primers has been used to assess this population in order to make a general screening of the most common bacteria found in wastewater. The data used to estimate the relative presence of the total bacteria within the biofilm, collected with 16S rRNA probes, were computed and are presented in supplemental materials (ANNEXE I).

3.3.4.3 Amplification of *amoA* and *nxrB*

To estimate the relative presence of AOB and NOB populations in the extracted biofilm, the partial sequence of either the *amoA* (AOB) or *nxrB* (NOB) genes from a selection of the principal AOB and NOB species found in nitrifying WWTPs (ANNEXE II) were aligned using the ClustalW2 software (European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridgeshire, UK). As in previous studies, we considered that AOA populations were negligible (Graham et al., 2007) and that *Nitrosomonas* spp. and *Nitrospira* spp. were considered as the principal AOB and NOB species in wastewater samples (Wen-Tso Liu, 2010). Degenerate primers (Table 3.1) were designed in order to obtain a broad spectrum of AOB and NOB populations. qPCR analyses were performed using 96-well plates (Eppendorf, Mississauga, ON) and the Perfecta® SYBR®Green FastMix® kit (Quanta, Beverly, MA) according to the manufacturer's instructions. DNA amplifications by qPCR for *amoA* were done using 40 cycles of initial denaturation at 95°C for 5 min; denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 46.6°C for 30 s and elongation at 72°C for 10 s. Amplifications of *nxrB* were done using 40 cycles of initial denaturation at 95°C for 5 min; denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 59.3°C for 30 s and elongation at 72°C for 10 s. An enriched nitrifying biofilm from pilot scale nitrifying process (STEPPE laboratory, École de technologie supérieure) was used as positive control.

Tableau 3.1 Newly designed degenerated oligonucleotides primers for qPCR analysis

Primers	Sequence (5' - 3')	target size	Amplicon size (bp)	Specificity ⁴
16SrDNA790f	GAT ACC CTG GTA GTC CAC GC	790-810 ¹	160	Total
16SrDNA950r	CAT RMT CCA CCG CTT GTG CGG G	922-950 ¹		bacteria
amoA930f	GTA TCM ATG YTG ATG TTC	930-947 ²	141	AOB
amoA1069r	CCC TCK GSA AAG CCT TCT TCA	1049-1070 ²		
nxB1061f	AGC CAR CAG ATC ATC TTC CGG TA	1061-1083 ³	124	NOB
nxB1184r	G GST TCA ACA AYT CGG GCA AGG	1163-1184 ³		

¹Relative position to the 16S rRNA gene of *E. Coli* (J01859).

²Relative position to the *amoA* gene of *Nitrosomonas europaea* (L08050.1).

³Relative position to the *nxB* gene of *Nitrospira marina* (KC884909.1).

⁴Specificity is related to selected species presented in ANNEXE II.

amoA and *nxB* genes were amplified from the same genomic DNA as the one used for the amplification of 16S rRNA which served as an indicator to the total bacterial population (supplemental information, ANNEXE I). qPCR amplification produced amplicons of 141- and 150-bp for the *amoA* and *nxB* genes, respectively. The data was quantified using a standard curve method (Morrison, Weis, & Wittwer, 1998; Schefe et al., 2006) and was confirmed by electrophoresis analysis by finding the expected amplicon base-paired length.

3.3.4.4 Fluorescent in situ hybridization (FISH)

In order to visualize the spatial distribution of the nitrifying community and to confirm qPCR analysis with the same experimental approach as qPCR analysis, multiple alignments of a partial region of the 16S rRNA from AOB and NOB species selected for this study (Table A.1) were performed using the ClustalW2 alignment tool (European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridgeshire, UK). Oligonucleotides of 20 and 21 bp were designed. The 5' ends of the oligonucleotides were coupled with either an ATTO 647 fluorochrome (AOBs; 5'-/ATTO647NN/AGG TGC TGC ATG GCT GTC GT) or an ATTO 488 fluorochrome (NOBs; 5'-/ATTO488N/AGC GGT GGA GCA TGT GGT TTA). Each of these oligonucleotides was tested using a nitrifying biofilm, from pilot scale nitrifiers enrichment (as mentioned above), as positive control and a suspension of heterotrophic bacteria (ThermoScientific) as negative control (results not shown). Finally, a schist grain without

staining has been used to visualize if the sample has auto fluorescence and checked with the Hoechst staining for positive microorganism presence on each sample (Monger & Landry, 1993). The biofilm was stained with Wheat Germ Agglutinin (WGA) coupled with an ATTO 555 fluorochrome, in order to visualize the structures and polysaccharide biopolymers secreted by the microorganisms. Each test was done directly on the schist grains. Each grain was washed 3 times in PBS buffer and fixed with cold paraformaldehyde (4 %). Hybridization was performed as described by Manz et al. (1992). Formamide was added to ensure optimal hybridization strengency: Schist grains were completely covered with hybridization buffer [500 μ L; 0.9 M NaCl, 0.02 M Tris (pH 7.5), 0.01 % SDS, 20 % formamide]. As a first step, primers for AOBs ATTO 647 were added with the hybridization buffer and incubated for 4 to 18 hrs at 58°C. The grains were then washed in the buffer [0.9M NaCl, 0.02M Tris (pH 7.5), 0.01% SDS, 20 % formamide] for 15 min at 48 °C, and incubated with the NOBs ATTO 488 primers for 4 to 18 hrs at 55°C. Afterward, the schist grains were gently washed in a washing buffer and then in a second buffer [0.9 M NaCl, 0.02 M Tris (pH 7.5), 0.01 % SDS] for 15 min at 48°C. For the final step, WGA 555 (5 μ g/mL) was added with enough volume to cover the grains and incubated for 10 min at room temperature. The schist grains were then washed in PBS and analyzed within 24 hrs by confocal microscopy. Data acquisition was performed with a Zeiss LSM780 confocal microscope equipped with Zen software (2011 version; Zeiss, Hamburg, Germany). With the 3-D image, the intensity of the fluorescent emission and the volume of the sample was measured. This technique using the intensity/volume ratio, analogous to the intensity correlation quotient (ICQ) (Li et al., 2004), is an alternative way to evaluate the targeted presence on a sample where direct quantification is impossible. That is the case with the schist grain because of the impossibility of deeply zooming the sample. Results were compared with qPCR analysis as a second observation of the development of the biofilm.

3.3.4.5 Data analysis

The 16S rRNA qPCR data were calculated as a function of the total amount of DNA. This way, for each sample, a relative bacteria population is expressed as a percent of the overall

DNA extracted. The same exercise was done with *amoA* and *nxrB* qPCR and the only differences were that each samples yields results expressed in percent of AOB and NOB of the mean presence of bacteria (16S rDNA results) within biofilm. This can highlight the development of the nitrifying population over the bacterial biofilm.

In order to do this, all the Cq results provided by the qPCR analysis are converted into a bacterial unit equivalent using an average of the initial number of targeted gene copies per genome and an average of the bacterial genome mass.

3.3.4.6 Statistical analysis

To determine if there were significant differences between the AOB and NOB presence in test and control cells, statistical analyses were performed using an F-test and a one-way Student t-test. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

3.4 Results

3.4.1 Bacteria development in biofilter cells (qPCR 16SrRNA)

Data on the relative presence of total bacterial population within the biofilm showed that there were no significant differences between the test and the control cell for all three tests conditions. The same applies for the test conditions themselves (ANNEXE I), with mean values of 16.4 ± 1.7 % for the test cells and 17.6 ± 1.7 for the control cells. Given that this research effort is performed to observe the development of the nitrifying bacterial population, it has been deemed that the growth in microbial population could be summarized as the average percentage, in order to focus the efforts on the AOB and NOB.

3.4.2 qPCR amplification of *amoA* and *nxrB*

Each data set is divided, based on the various operational parameters that were tested (Aerobic conditions, Modified backwash parameter and Inflow Adjustment). The

values shown are expressed as a percentage of relative presence in relation to the total bacterial population.

Data on **aerobic conditions** for the test cell (Figure 3.3-A, left panel), indicate that relative AOB populations (*amoA*) within the biofilm were significantly richer at a depth of 1 and 4 feet than in the control cell with values between 0.11 to 0.50 % for the test cell and 0.043 to 0.074 % for the control cell. Data on the relative NOB population (*nxrB*) showed that they are generally present at significantly higher levels in the test cell as compared to the control cell. In particular at 4 and 5 feet with values ranging from 0.013 to 0.033 % in the test cell and 0.003 to 0.005 % in the control cell (Figure 3.3-A, right panel). Anoxic conditions in the control biofilter did not promote the growth of nitrifying bacteria, as no significant growth of nitrifying bacteria has been noticed into each depth of the control cell.

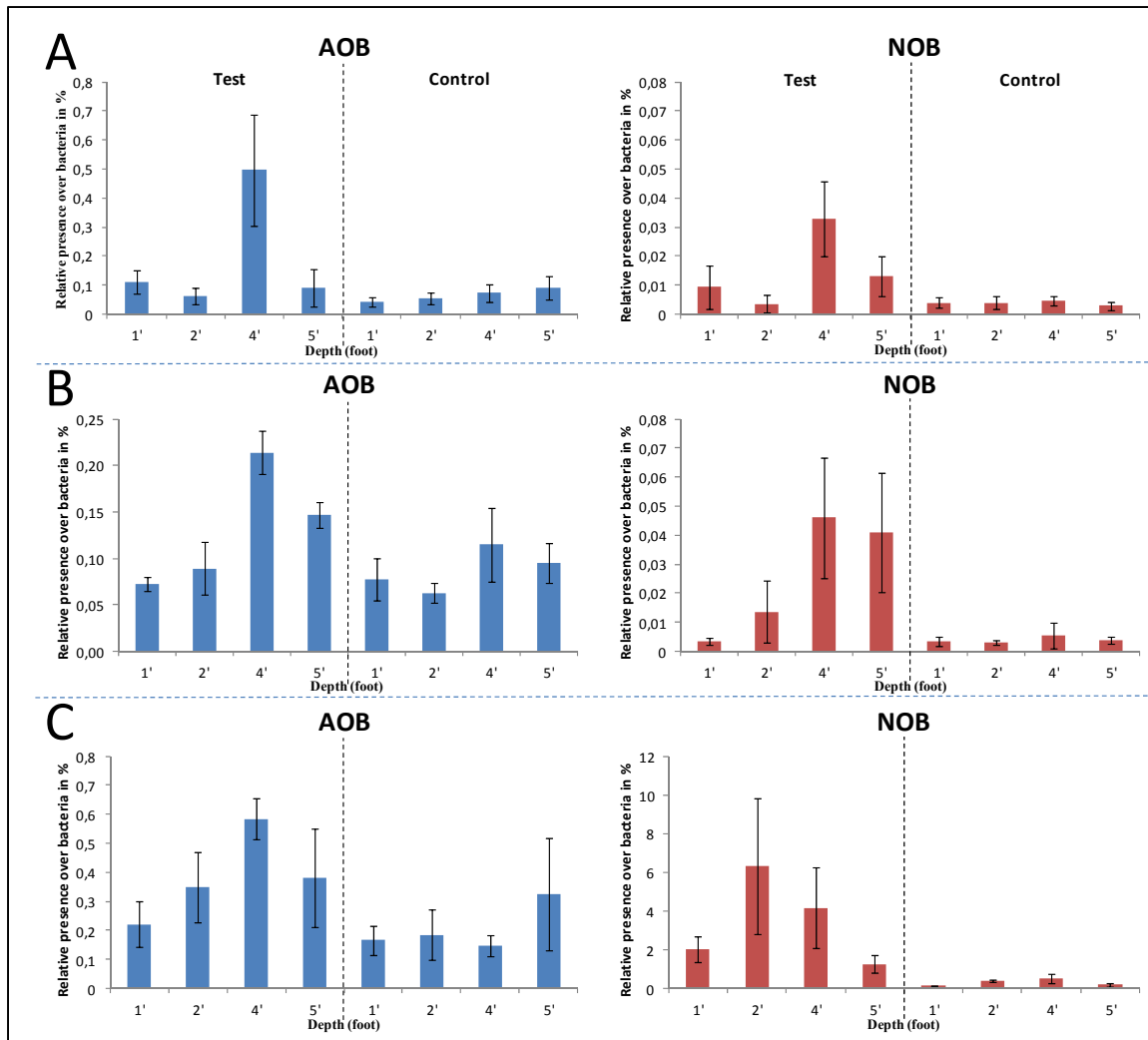


Figure 3.3 Development of the nitrifying population within the biofilm samples divided in AOB and NOB as the principals nitrifying microorganisms.

All data is in % of relative presence of the nitrifying bacteria over the global heterotroph and autotroph bacteria population within the samples. Each depth studied are represented as 1, 2, 4 and 5 feet depth (1', 2', 4' and 5'). Chart **A** shows the results comparing the test and control cell for the development of the AOB and NOB during the Aerobic testing conditions (3000 m³ air/h). Chart **B** shows the results obtained by comparing the test and control cell for the development of the AOB and NOB with backwashing modification (shorter and less intense cell wash procedures; 2 min of de-clogging, 6 min of backwash and 1 min rinse). Chart **C** shows the results from comparing the test and control cell for the

development of the AOB and NOB during the inflow adjustment (regulation of the hydraulic load on the cell and increases of the filtration time through the schist bed; a physical restriction allows an opening of 2.27 m² instead of 10.1 m² which induce a hydraulic surface loading of approximately 5 m³/m²/h).

Data collected on the **modified backwash parameters** (Figure 3.3-B, left panel) showed a significant increase in the relative AOB population throughout the lower part of the media bed (4 and 5 feet depth) compared to the control cell, with values between 0.15 to 0.21 % for the test cell and 0.09 to 0.11 % for the control cell. Data on the relative NOB population showed significantly higher levels in the test cell as compared to the control cell especially at the 4 and 5 feet depth as observed for the AOB (Figure 3.3-B, right panel) with values ranging from 0.04 to 0.046 % for the test cell and 0.004 to 0.006 % for the control cell. The highest value observed for both AOB and NOB were at 4 feet in the test cell with values of 0.21 % and 0.046 % for the AOB and NOB respectively.

Analysis on **inflow adjustment** conditions showed the highest values on both relative AOB and NOB population. Data showed a significant increase in the relative AOB population especially at the 2 and 4 feet depth compared to the control cell, with values between 0.35 to 0.58 % for the test cell and 0.15 to 0.19 % for the control cell (Figure 3.3-C, left panel). Data on the relative NOB population resulted in unexpected observations. Indeed, they showed significant increase in relative population at all depth (1, 2, 4 and 5 feet) (Figure 3.3-C, right panel) compared to the control cell, but also compared to the two previous conditions studied. The values obtained varied between 1.3 to 6.3 % for the test cell and 0.13 to 0.52 % for the control cell. Even in the control cell, the relative NOB population was significantly higher in comparison to the other observations done on the control cell. Highest observations in test cell were at the 2 feet depth with 6.3 % and at the 4 feet depth with 0.52 % in the control cell.

3.4.3 FISH analysis

Two sets of schist samples (test and control) were used for FISH analysis in order to view the intensity/ratio profile of the AOB and NOB in the biofilm of the schist grains for each depth (Figure 3.4) and spatial distribution of nitrifying clusters (Figure 3.5). The sample sets originated from the test cells during the *Modified backwash conditions*. Data in Figure 3.4 shows a significant increase of the intensity ratio of AOB and NOB in the test cell at the lower part of the media bed (4 and 5 feet depth), as compared to the same sample set of the control cell. These results are in agreement with those obtained by qPCR for the same sample. FISH and qPCR data confirmed that the presence of AOB and NOB have significantly increased in the biofilm.

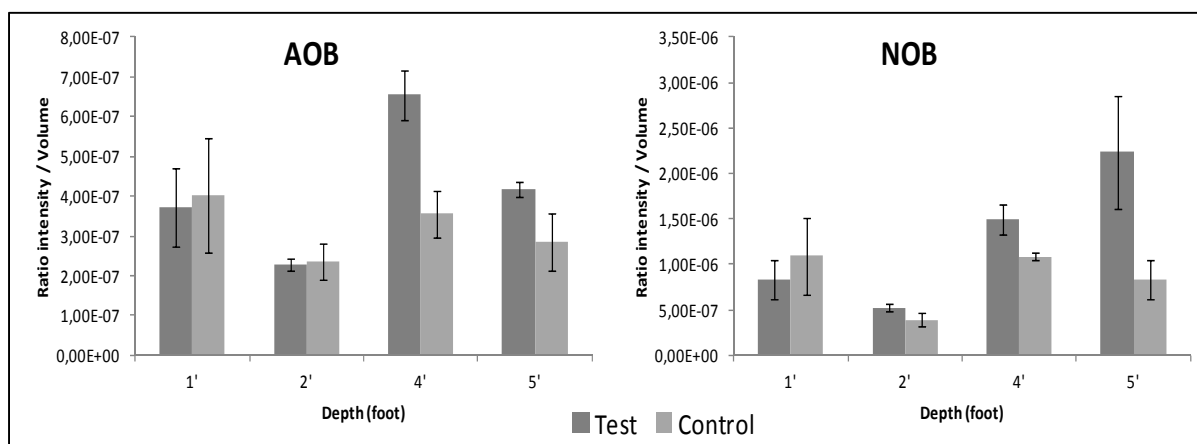


Figure 3.4 Ratio of emission intensity from FISH analysis for total biofilm volume with ATTO 647 dye for AOB analysis and with ATTO 488 dye for NOB analysis

Schist samples came from the backwash modification test as "Test" refers to the testing cell and "Control" refers to the control cell. Each depth studied are represented as 1, 2, 4 and 5 feet depth (1', 2', 4' and 5'). Intensity and volume are both calculated with Carl Zeiss ZEN software.

Distinct aggregates of AOB and NOB were observed on the biofilm (Figure 3.5, bright dots), and suggest that these sub-populations grow mainly in the upper portion of the matrix where

the O_2 diffusion is most effective. The results show that the AOB and NOB aggregates are mainly located in the first 40 μm of the biofilm. There is no apparent co-functional structure in the development of these groups of nitrifying microorganisms within the biofilm. This suggests that the substrates for the NOB metabolism do not limit the spatial organization of these microorganisms within the biofilm.

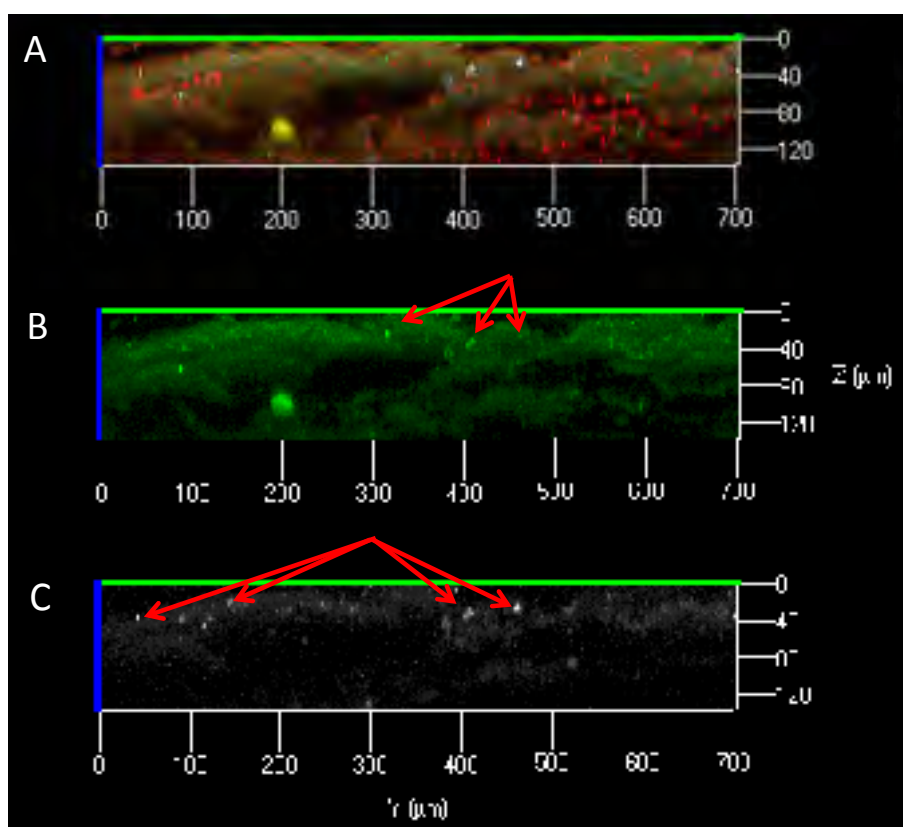


Figure 3.5 Confocal imagery (FISH) of a schist sample from test cell, at 2 feet depth, during the modified backwash conditions. Sectional view of 3D stack with a 20X objective

Figure 3.5 shows in **A**, staining with WGA 555, ATTO 647 (AOB) and ATTO 488 (NOB), in **B**, staining with ATTO 488 (NOB) only, and in **C**, staining with ATTO 647 only (AOB). Y axis shows the width of the biofilm segment and Z axis shows the depth of the biofilm. Arrows highlights a few bright dots corresponding to AOB and NOB clusters within the biofilm. They appeared mainly in the upper layers of the biofilm (inside 40 μm).

3.5 Discussion

The current results reveal that it is possible and reliable to estimate the presence of several AOB and NOB species with a single pair of degenerate primers, thus offering a more realistic interpretation of the development of the nitrifying population within the dynamic development of microorganisms in an attached growth biofilm of a wastewater treatment plant.

The principle of quantification analysis by qPCR is based on the initial quantity of the number of copies of the targeted gene. If it is assumed that the microorganisms have, on average, 3.6 copies of the 16S rRNA gene in their overall genetic material (Dionisi et al., 2002; Klappenbach et al., 2001), and that the mean mass of the DNA matrix is estimated to be 6.72×10^{-12} μg per cell (Bak et al., 1970; Dolezel et al., 2003; Gillis et al., 1970), the bacterial population constitutes 17 ± 1 % of the biofilm in the whole biofilter (ANNEXE I). This calculation thus provides the relative presence percentage of the bacteria within the isolated DNA tank of the biofilm covering the schist grains. In accordance with other studies, for the *amoA* and *nxrB* markers, we assume that there are a mean of 2 and 4 copies of these genes per AOB cell (Dionisi et al., 2002; McTavish et al., 1993) and NOB cell (Gruber-Dorninger et al., 2015; Pester et al., 2014) respectively in order to interpret the qPCR data as a relative percent of presence.

3.5.1 Effect of tested conditions on the development of AOB and NOB within the Bacterial population

The data presented in Figure 3.3 shows a distinct development of the nitrifying population in the test cell, as compared to the control cell. These results confirm that the tested conditions had a beneficial impact on the development of the nitrifying biofilm. Knowing that the WWTP used in this study was not designed to sustain nitrification, these observations proved the possibility to enrich the biofilm in order to expand the treatment potential. It is important to note that the enrichment of the nitrifying population does not change the overall bacterial

population. This is an advantage in a fixed biomass process as it is important to avoid clogging by an overgrowth of biomass.

Robust analysis of qPCR on fixed biomass in a full-scale treatment plant are rare. Therefore, very little comparative data on the relative population of AOB and NOB are available in literature. The relative proportion data of this study for AOB in test cell are about one order of magnitude greater, regardless of the depth, than the data reported in similar studies but conducted in activated sludge samples (Dionisi et al., 2002a; Dionisi et al., 2002b). The data observed during the three tested conditions (*Aeration*, *Modified backwash* and *Inflow adjustment*) show that there is an increase in the relative presence of the AOB in the lower part of the filter bed (4 and 5 feet depth). This targets the location of the filter where it is possible to maximize the development of these bacteria in order to promote the phenomenon of nitrification. In this section of the media bed, the concentration of organic carbon is considerably lower and dissolved oxygen higher (especially at the 4 feet depth) in a Biocarbhone® process. Consequently, this creates favorable conditions for chemolithoautotrophic bacterial activities.

The relative population development of NOB followed the same trend as AOB, with a more marked increase in the relative presence of this population in the lower section of the filter bed. However, the values observed in the *Aeration* and *Modified backwash* tests were lower than in the AOB. It was during the *Inflow adjustment* test that we observed a significant increase in the relative presence of NOB compared to AOB. These results are consistent with previous studies (Dionisi et al., 2002; Gieseke et al., 2001; Schramm et al., 1999). This increase in relative presence could be explained by the versatility of NOB, particularly for the nitrospira species and commamox, which have demonstrated substantial metabolic versatility (Daims et al., 2015; Koch et al., 2015; Lucker et al., 2010; Watson et al., 1986). They include the use of various organic compounds in addition to nitrites and CO₂. It is also possible that conditions imposed by inflow adjustment and wastewater quality (Chen et al., 2006) during this test may have contributed to an environment particularly conducive to the development of NOB.

The qPCR analysis approach with degenerate primers revealed the impact of the different operational conditions tested on the development of the main nitrifying bacterial species within a fixed biomass biofilm as well as the depths in the filter media where observations were significant. As shown by Graham et al. (2007), interactions between AOB and NOB are unpredictable, but closely tied one to the other. The global analysis of the population of AOB and NOB, not being purely quantitative, makes it possible to shed light on the relationship of these microorganisms with the biofilm in which they develop.

A change in the relative percentage presence of nitrifying bacteria does not necessarily mean an increase or decrease in the number of individuals in the studied population but that their presence, and therefore possibly, their potential activity in terms of treatment, is more or less marked throughout the biofilm. Being able to track this relationship between microbial biofilm species and to know the different elements that may play a role in their development offers a perspective of control over fixed biomass type bio-treatments like BAF, that was previously out of reach.

FISH analysis has been performed with oligonucleotide primers that bind to 16S rRNA gene in a region preserved among multiple AOB and NOB species. The purpose was to detect and pinpoint the greatest number of those microbial groups within the biofilm with the same theoretical approach as for qPCR analysis. Baptista et al. (2014) have already showed an agreement between the FISH and qPCR analysis and the data presented here corroborates these observations. Data showed that the nitrifying bacteria are present at any depth of the submerged test bed, but their intensity increases in the lower portion of the biofilter, where the biofilm thickness is significantly less. A thickness difference of nearly 50 % was observed in the present study between samples from the upper part and the lower part of the biofilter. This suggests that, within the context where the presence of heterotrophic bacteria is lesser, the competitiveness factor for bacterial growth favors nitrifying bacteria, since their growth is relatively slow (Antoniou et al., 1990; Kindaichi et al., 2006). The analysis of the cumulative emission intensity over all layers in the 3-D image (intensity/ratio) has proved to be effective to generalise the FISH assay when it is impossible to zoom close enough on the

sample for direct quantification. This is not a quantification tool; nevertheless, it permits to evaluate the relative presence of targeted organisms within the biofilm. This information, to which we add the results of qPCR analysis, permits to obtain a double confirmation of the effect of testing conditions on the development observed for the AOB and NOB population. As shown in Figure 5, the observable AOB and NOB aggregates (bright dots) appears to break apart from each other. It seems they don't depend on a close relationship for their development. These results suggest that the AOB and NOB are probably independent from one and the other, even if theoretically, the NOB uses nitrites from the AOB to perform oxidation into nitrate. The newly discovered Comamox *Nitrospira* (Holger Daims et al., 2015) that can perform complete nitrification and the expended metabolic versatility from the genus *Nitrospira* (Koch et al., 2015) would effectively explain our observations where NOB do not seem to need to be tightly bound to AOB clusters. The presence of Comamox microorganisms in an attached growth biofilm remains to be confirmed in further analysis to validate our hypothesis.

3.6 Conclusion

The results from this work opens new avenues for all municipalities that uses attached growth biological processes in order to enhance their treatment to perform nitrification. Operational conditions that were tested revealed that it was possible to encourage the development of the nitrifying population even if it was not initially designed for the treatment of ammonia nitrogen. The biofilm within the biofilter varies as a function of depth, and the lower portion of the bed forms a more appropriate area for the growth of nitrifying bacteria. Aeration is essential for the maintenance of AOB and NOB growth and have its critical impact at the maximum aeration point in the lower part of the treatment cell. Shorter wash, air and water flow, parameters preserve the thinness of the biofilm and provide an opportunity for nitrifying populations to increase their presence within the biological mass. Finally, flow control in order to reduce the filtration velocity has a positive influence on the growth of nitrifying bacteria, whereas they remain in contact with the supply of nutrients for

a longer period. Nevertheless, additional data about the nitrifying population is still required in order to tie the detected quantity of AOB and NOB to their respective treatment results.

CHAPITRE 4

ARTICLE 2: OPERATIONAL MODIFICATIONS FOR THE DEVELOPMENT OF NITRIFYING BACTERIA IN A LARGE-SCALE BIOLOGICAL AERATED FILTER AND ITS IMPACT ON WASTEWATER TREATMENT.

François-René Bourgeois¹, Daniel G. Cyr² and Frédéric Monette¹

¹Département de génie de la construction. STEPPE – Station Expérimentale des Procédés Pilotes en Environnement, École de technologie supérieure – Université du Québec
1100 Notre-Dame Street West, Montréal (Québec), Canada H3C 1K3

²Laboratoire de toxicologie environnementale, INRS-Institut Armand-Frappier – Université du Québec, 531, boulevard des Prairies, Laval (Québec), Canada H7V 1B7

Soumis pour publication le 19 avril 2018 et accepté pour publication le 14 octobre 2018 dans
la revue *Water Science and Technology*

4.1 Abstract

To develop a better understanding for fixed biomass processes, the development of a nitrifying bacterial biofilm as well as the performance of treatment during modifications to operational conditions of a full-scale submerged biological filter were examined. The development of the nitrifying biofilm was investigated at four depth levels (1, 2, 4 and 5 feet). The result of bacterial subpopulations analyzed by qPCR relative to the physico-chemical parameters of the wastewater during the various tests (sustained aeration, modified backwash parameters and inflow restriction) revealed an increase of the relative presence of nitrifying microorganisms throughout the biofilm (especially for nitrite oxidizing bacteria; NOB), but this was not necessarily accompanied by a better nitrification rate. The highest observed nitrification rate was 49% of removal in the test cell during backwashing conditions whereas the relative ammonia oxidizing bacteria (AOB) population was 0.032% and NOB was 0.008% of the total biomass collected. The highest percentage of nitrifying bacteria observed (0.034% AOB and 0.18% NOB) resulted in a nitrification rate of 21%. The treatment of organic matter determined by measuring the chemical and biochemical oxygen demand (COD, CBOD₅) was improved.

Key words: ammonia oxidizing bacteria (AOB); attached growth biofilm; biofilters; nitrification; nitrite oxidizing bacteria (NOB); wastewater

4.2 Introduction

The difficulties in regulating nitrification in wastewater effluent are well known. The common installation is two biological treatment units in series: the first for removing carbon nutrients (secondary treatment) and the second for nitrification (tertiary treatment). Single-sludge secondary treatment process is also common but harder to operate. However, it has been shown that biological aerated filters (BAF), under optimal conditions, can sustain both treatments in a single step (Mendoza-Espinosa & Stephenson, 1999). This offers an economical avenue for limiting levels of ammonia in the effluent. Wastewater effluent nitrification involves a two-step process in which ammonia-oxidizing organisms (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA) (Koops et al., 2006; Stahl & Torre, 2012), oxidize ammonia to form nitrite and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) (Teske et al., 1994), subsequently oxidize nitrites to nitrates. Among the NOB, some species such as the recently discovered *Nitrospira* bacteria (comammox) can completely oxidize ammonia (Daims et al., 2015). The biochemical relationship between AOB and NOB is well known and has been used as a tertiary treatment with activated sludge (Blackall & Burrell, 1999). Attempts to use this biochemical relationship for a one step nutrient removal in a fixed biomass process was revealed to be complicated and not easily applicable (Bovendeur et al., 1990).

Several studies (Gullicks, Hasan, Das, Moretti & Hung, 2011; Mendoza-Espinosa & Stephenson, 1999; Pramanik et al., 2012) have reported that the performance of BAFs in reducing the nutrient load of primary influent may be influenced by the filtration rate (hydraulic loading), organic loading, aeration, efficiency of oxygen use and backwashing of the filters. How these influence the distribution of microbial populations on the biofilm remains largely unexplored.

Pramanik et al. (2012) reported that the use of BAFs was more efficient in removing ammonia from wastewater than with activated sludge. However, information at full scale on the efficiency of BAFs under different operating and environmental conditions is still lacking. Furthermore, correlations between bacterial populations and the efficiency of the treatment have, until now, only been studied under small scale laboratory conditions (Li et al., 2016) and has yet to be tested in a large-scale setting.

The objective of this study was to correlate the development of nitrifying bacteria with water quality following operational assays and validate if nitrification is directly favored within a fixed growth biofilm in a large-scale wastewater treatment facility.

4.3 Material and methods

4.3.1 WWTP description and wastewater characteristics

A municipal wastewater treatment plant (WWTP; Auteuil Laval, Quebec, Canada) using a biological filtration process was used for these studies. The mean inflow of wastewater (33 000 m³/d) was distributed equally on two separated down-flow aerobic biofilters using a Biocarbon® (OTV) submerged biofilter (attached growth). As shown in Figures 4.1-A and B, each biofilter is composed of 10 process cells filled with 1.8 m of “Biodagen” (grain-sized expanded schist with a nominal diameter of 3-6 mm). Each process cell opens (filtration mode) or closes (waiting mode) depending on the inflow level and is operated in rotation within the biofilter. A waiting cell may be waiting up to one and a half hour before its rotation to filtration. In filtration mode, and with one cell in backwashing, the designed hydraulic surface load on each media bed (treatment cell) is assumed to vary on average from 4.8 to 9.4 m³/m²/h (filtration time of 22.5 and 11.5 min) with a maximum inflow of between 33 000 and 65 000 m³/d. Experimental data suggests an average inflow hydraulic surface load of 7 m³/m²/h (filtration time of 15.4 min) throughout the study. Two side-by-side cells (shown in green in Figure 1) were selected from each biofilter, excluding those that were the closest to the entry inflow point. The wastewater consisted mainly of domestic sewage. The typical influent characteristic load (and concentration) for a 5-day

carbonaceous biochemical oxygen demand (CBOD₅), chemical oxygen demand (COD), total suspended solids (TSS), ammonium-nitrogen (NH₄⁺-N) and total phosphorus (P_{tot}) levels are 3033 kg-O₂/d (93 g-O₂/m³), 9402 kg-O₂/d (286 g-O₂/m³), 6400 kg/d (197 g/m³), 369 kg-N/d (11.3 g-N/m³) and 91 kg-P/d (2.9 g-P/m³) respectively. The average removal efficiency of the plant prior to this study was 87 % for CBOD₅, 84 % for COD, 95 % for TSS, and 75 % for P_{tot} respectively. There were no data on ammonium-nitrogen (NH₄⁺-N) removal rates. This WWTP was not able to sustain nitrification prior to the beginning of the study. The bioreactors had mean temperatures of 18.5 ± 1.5°C and were operated at a pH of 6.8 ± 0.3 during the sampling times.

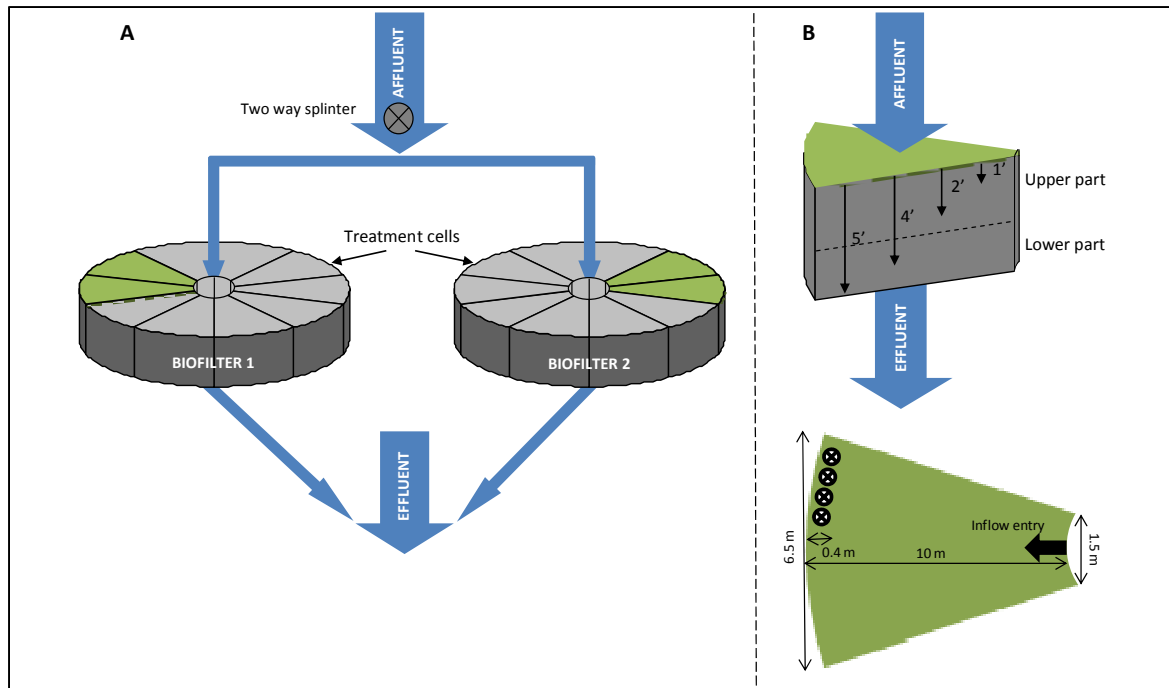


Figure 4.1 Detailed plan of (A), biofilters with treatment cell (gray) and selected test cell (green) and water distribution and (B), sectional view of a media bed with each depth, as used in the current work

Each depth used in the current work is defined by 1' (0.3 m) and 2' (0.6 m) presented as upper part of the cell, 4' (1.2 m) and 5' (1.5 m) deep presented as lower part of the cell. Media bed of a treatment cell is composed of expanded schist grain nominal diameter 3-6 mm and has a total height of 1.8 m (6'); plan view of a treatment cell with site location (cross) of sampling devices (grain sized schist and wastewater). Only one treatment cell is shown but the setup is the same for all four selected treatment cells.

4.3.2 Testing conditions

Three different operational conditions were assessed over three years: **1. Aerobic conditions** in which 3000 m³/h of processed air was injected through the test biofilter, whereas in the control biofilter, no processed air was injected; **2. Modified backwash parameters.** Modified backwash parameters for the cells in the test biofilters where as follows: Unclogged procedure for 2 min with an air injection alone, followed by backwash and water rinse for 6

min followed by water alone for 1 min (9 min). Filtration time between backwashes was reduced from 16 to 12 hrs. Control biofilters followed the same procedure except that the backwash lasted 11 min, instead of 6 min, and filtration time between backwashes was 16 hrs. The rotation of waiting cells of a Biocarbon® filter was set at 30 min in both the test and control cells; **3. Inflow adjustment.** The inflow was restricted to 2.3 m² (test) instead of 10.1 m² (control). This restriction caused an average reduction of 36 % of the normal wastewater inflow, a reduction of the nutrient load and an average filtration time of 21 min with a flow rate of 5 m³/m²/h (controls had no restriction and displayed an average filtration time of 15.4 min with a flow rate of 7 m³/m²/h). Processed air was maintained at 3000 m³/h in the test and the control cell for the modified backwash and inflow tests.

Aerobic conditions and **modified backwash parameters** were used to compare results from one biofilter (test) to the other (control) while the **inflow adjustment** compared a process cell with an adjacent control cell. For each test condition, a minimum conditioning period of 5 weeks was followed before schist grain sampling.

4.3.3 Samples

4.3.3.1 Expended schist grain

Samples of expanded schist grain were taken by core sampling in the media bed (Figure 4.2). Two side by side cells were selected per biofilter, excluding the ones that were too close to the inflow entry point. Selected cells were symmetrically opposed in each biofilter. Each sampling point was done at 4 different depths over the schist bed (Figure 4.1-B): 1, 2, 4, and 5 feet (0.3, 0.6, 1.2 and 1.5 m). Each schist sample was preserved at -20°C in a sterile 50 mL tube containing glycerol for microbiological analysis.

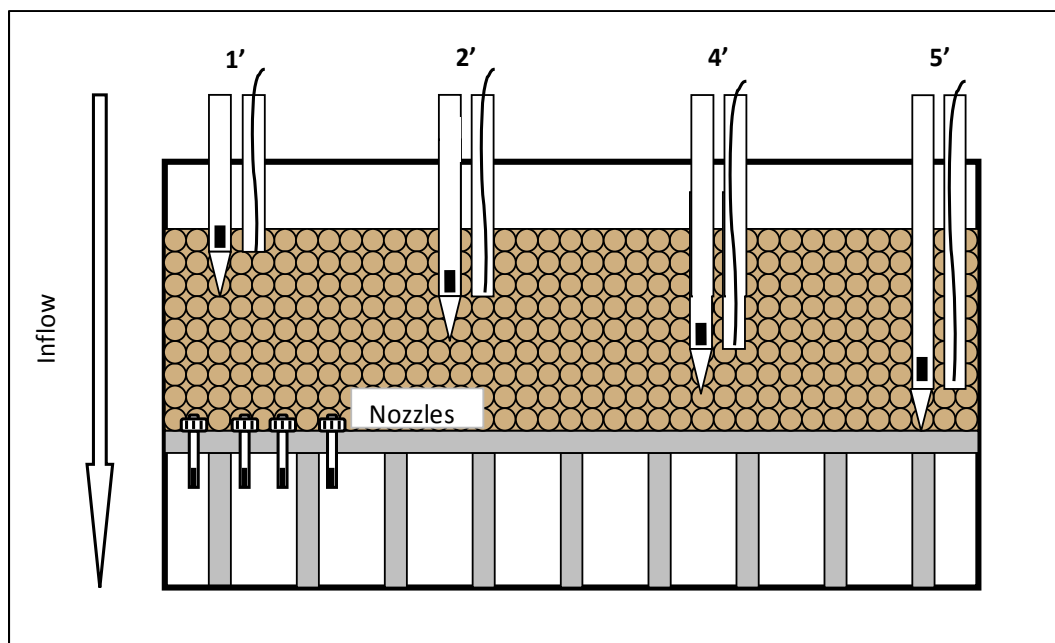


Figure 4.2 Sectional view of a treatment cell with grain and wastewater sampler device

A grain-sized schist bed shown in Figure 4.2 has a height of 6' (1.8 m) and is supported on an underdrain plate that incorporates plastic nozzles (2500) for collecting the treated wastewater and for distributing backwash water and air (only few are shown here). Wastewater was collected with a peristaltic pump Easy-load®, Masterflex® model 7518-60 (not shown) with a LS-15 Masterflex® tubing for a 14 hours composed sample.

4.3.3.2 Wastewater sampling and physico-chemical analysis

Wastewater was collected with an Easy-load® peristaltic pump (Masterflex®, model 7518-60) with LS-15 Masterflex® tubing, in accordance with the Ministère de l'Environnement du Québec's Centre d'Expertise en Analyse Environnementale (CEAEQ-MDDEFP) methodologies (Figures 4.1 and 4.2). The protocol involved sampling proportional to the time with uptake rate of 1 liter per hour to compose a single sample at 14 hours. The sample was kept at 4°C in a polyethylene bottle. The wastewater was sampled twice a week at each sampling depth. Table 1 shows the physico-chemical parameters monitored during the study,

their respective analytical limits of detection (LOD) and reference methods (Rice, Bridgewater, & Association, 2012).

Tableau 4.1 Physico-chemical parameter monitored with limits of detection and references

Pollutant Parameter	Unit	LOD	Standard Methods reference
COD	mg/L	16.0	SM 5220
CBOD ₅	mg/L	1.0	SM 5210
N-NH ₄ ⁺	mg/L	1.0	SM 4500-NH ₃
Total alkalinity	mg/L	4.0	SM 2320
SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA et al., 2012); LOD: limit of detection; CBOD ₅ ; carbonaceous biochemical oxygen demand incubates for 5 days at 20°C ± 1°C.			

Data were obtained using a number of samples (n=5-10) for each parameter analyzed. The mean value of the inflow for each biofilter was also calculated as this could influence the nutriment load and filtration rate. The data was then correlated to the development of the nitrifying bacterial population.

4.3.4 Biofilm analysis

4.3.4.1 DNA extraction

Biological material was extracted from expanded schist grains of the biofilm by vigorously shaking 6 grains of similar size in the PBS buffer (10 mL) for 3 min followed by washing in PBS buffer (5-10 mL; three times). Genomic DNA was then extracted from 1.7 mL of biofilm mixture using a nucleic acid extraction kit (*Wizard Genomic DNA purification kit*, Promega, Madison, WI), according to the manufacturer's instructions. Each sample was eluted in a DNA rehydration solution prior to being diluted (100-1000 fold) with water and

stored at -20°C. DNA levels were quantified using the Quant-iT™, PicoGreen®, dsDNA test kit (ThermoScientific, Burlington, ON) (Ahn et al., 1996).

4.3.4.2 qPCR amplification of *amoA* and *nxrB*

To estimate the relative abundance of AOB and NOB populations in the extracted biofilm, the partial sequence of either the *amoA* (AOB) or *nxrB* (NOB) genes from a selection of the principal AOB and NOB species found in nitrifying WWTPs (ANNEXE III) were aligned using the ClustalW2 software (European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridgeshire, UK). As in previous studies, we considered that AOA populations were negligible (Graham et al., 2007) and that *Nitrosomonas* spp. and *Nitrospira* spp. were considered the principal AOB and NOB species in the wastewater samples (Wen-Tso Liu, 2010). Degenerate primers (Table 4.2) were designed in order to obtain a broad spectrum of AOB and NOB populations. qPCR analyses were performed using 96-well plates (Eppendorf, Mississauga, ON) and the Perfecta® SYBR®Green FastMix® kit (Quanta, Beverly, MA) according to the manufacturer's instructions. DNA amplifications by qPCR for *amoA* were done using 40 cycles of initial denaturation at 95°C for 5 min; denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 46.6°C for 30 s and elongation at 72°C for 10 s. Amplifications of *nxrB* were done using 40 cycles of initial denaturation at 95°C for 5 min; denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 59.3°C for 30 s and elongation at 72°C for 10 s. An enriched nitrifying biofilm from pilot scale nitrifying process (STEPPE laboratory, École de technologie supérieure) was used as positive control.

amoA and *nxrB* genes were amplified from the same genomic DNA as that used for the amplification of the 16S rRNA which was used as an indicator of the total bacterial population (supplemental information, ANNEXE I). qPCR amplification produced amplicons of 141-and 150-bp for the *amoA* and *nxrB* genes, respectively. The data was quantified using a standard curve method (Morrison et al., 1998; Scheffe et al., 2006) and the size of the amplicons confirmed by electrophoresis.

Tableau 4.2 Newly designed oligonucleotides primers for qPCR analysis

Primers	Sequence (5' - 3')	target size	Amplicon size (bp)	Specificity ⁴
16SrDNA790f	GAT ACC CTG GTA GTC CAC GC	790-810 ¹	160	Total
16SrDNA950r	CAT RMT CCA CCG CTT GTG CGG G	922-950 ¹		bacteria
amoA930f	GTA TCM ATG YTG ATG TTC	930-947 ²	141	AOB
amoA1069r	CCC TCK GSA AAG CCT TCT TCA	1049-1070 ²		
nxB1061f	AGC CAR CAG ATC ATC TTC CGG TA	1061-1083 ³	124	NOB
nxB1184r	G GST TCA ACA AYT CGG GCA AGG	1163-1184 ³		

¹Relative position to the 16S rRNA gene of *E. Coli* (J01859).

²Relative position to the *amoA* gene of *Nitrosomonas europaea* (L08050.1).

³Relative position to the *nxB* gene of *Nitrospira marina* (KC884909.1).

⁴Specificity is related to selected species presented in ANNEXE III.

4.3.5 Data analysis

Relative populations of AOB (*amoA*) and NOB (*nxB*) detected in the samples were calculated in relation to the total genomic DNA collected within the biofilm sample as previously reported (H. M. Dionisi et al., 2002; Dryburgh, 2011; Gruber-Dorninger et al., 2015; Pester et al., 2014). Estimation of the relative abundance of total bacteria within the biofilm, as determined using 16SrRNA levels, were calculated and presented in supplemental materials.

4.3.6 Statistical analysis

To determine if there were significant differences between the physico-chemical parameters and bacterial populations in test and control cells, statistical analyses were performed using an F-test and a one-way Student t-test. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

4.4 Results

4.4.1 Physico-chemical analysis

Aerobic conditions: At each depth analyzed (1, 2, 4 and 5 feet), data on aerobic conditions (Figure 4.3-A) show a reduction of 57 and 74 % in COD and CBOD₅ from the wastewater inlet to the lower part of the aerated test cell. In contrast, a negligible reduction of COD (0.4 %) and a 16 % increase in CBOD₅ was observed from the inflow throughout the control cell. In the aerated cell, a 17 % reduction in NH₄⁺-N was observed. There was no removal of NH₄⁺-N in the control cell but rather a significant increase of 11 %. Statistical analyses indicate a significant difference for COD, CBOD₅ and NH₄⁺-N reduction between the test and control cell. Data on alkalinity (data not shown) and NH₄⁺-N indicated a reduction of 33 ± 11 kg/d of NH₄⁺-N and an alkalinity consumption of 210 ± 22 kg/d (ratio $\text{alk}_{\text{Cons}}/\text{N}_{\text{Reduc}} = 6.4 \pm 2.8$). This decrease further corroborates the NH₄⁺-N reduction since the consumption of alkalinity is theoretically 7.14 fold higher than the amount of nitrified NH₄⁺-N (Metcalf and Eddy, 2014). The average influent flows (Q) on the biofilters were similar throughout the experiments (16 895 m³/d for biofilter 1 and 16 930 m³/d for biofilter 2). Data of dissolved oxygen (Figure 4.4-A) shows an increase in the lower part of the testing cell with values between 4 and 6 mg-O₂/L. Data of the control cell were in the limits of detection with average values of 1 mg-O₂/L.

Modified backwash parameters: Data on backwash conditions (Figure 4.3-B) indicate a reduction of COD and CBOD₅ of 49 and 83 % respectively in the test cell, while a reduction of 45 and 77 % was observed in the control cell. The observed efficiency for the treatment of carbonaceous nutrients was not significantly different between test and control cells. However, the percent of NH₄⁺-N removed in the test cells (49%) was significantly higher than in control cells (16%). Data on alkalinity and NH₄⁺-N indicate a reduction of 102 ± 19 kg/d of NH₄⁺-N and an alkalinity consumption of 737 ± 158 kg/d for the test cell (ratio $\text{alk}_{\text{Cons}}/\text{N}_{\text{Reduc}} = 7.2 \pm 2.9$). A reduction of 35 ± 19 kg/d of NH₄⁺-N and an alkalinity consumption of 246 ± 100 kg/d was observed for control cells (ratio $\text{alk}_{\text{Cons}}/\text{N}_{\text{Reduc}} = 7.0 \pm 4.8$), thereby confirming the increased nitrification. The average influent flow on the

biofilters was 16 528 m³/d for biofilter 1 and 18 070 m³/d for biofilter 2. Interestingly, the treatment appears to peak at a depth of 4 feet (Figure 4.3-B). Data of dissolved oxygen (Figure 4.4-B) shows an increase at 4' depth in both test and control cell with an average values between 5 and 6 mg-O₂/L. There is no significant differences of dissolved oxygen between the test and control cell.

Inflow adjustment. Data on inflow restriction conditions (Figure 4.3-C) show a significant reduction of 69 and 87 % of COD and CBOD₅ in the test cell while a reduction of 53 and 62 % was observed for the control cell, in particular for the lower portion of cell. Removal of NH₄⁺-N was observed only in the test cell, and reached 21 %. Significant differences in NH₄⁺-N removal between the test and control cell was also confirmed for the lower depths of the test cells. Data on alkalinity and NH₄⁺-N show a reduction of 39 ± 14 kg/d of NH₄⁺-N and an alkalinity consumption of 292 ± 95 kg/d for the test cell (ratio $\text{alk}_{\text{Cons}}/\text{N}_{\text{Reduc}} = 7.5 \pm 5.1$), confirming the nitrification process. The average influent flow on biofilters was 15 670 m³/d for biofilter 1 and 17 070 m³/d for biofilter 2. Data of dissolved oxygen (Figure 4.4-C) shows an increase in the lower part of the testing cell with values between 5 and 6 mg-O₂/L and significant differences of the 1' and 5' feet depth between the test and control cell. Data of the control cell shows dissolved oxygen at the 2' and 4' depth while at 1' and 5' values were at an average of 1 mg-O₂/L.

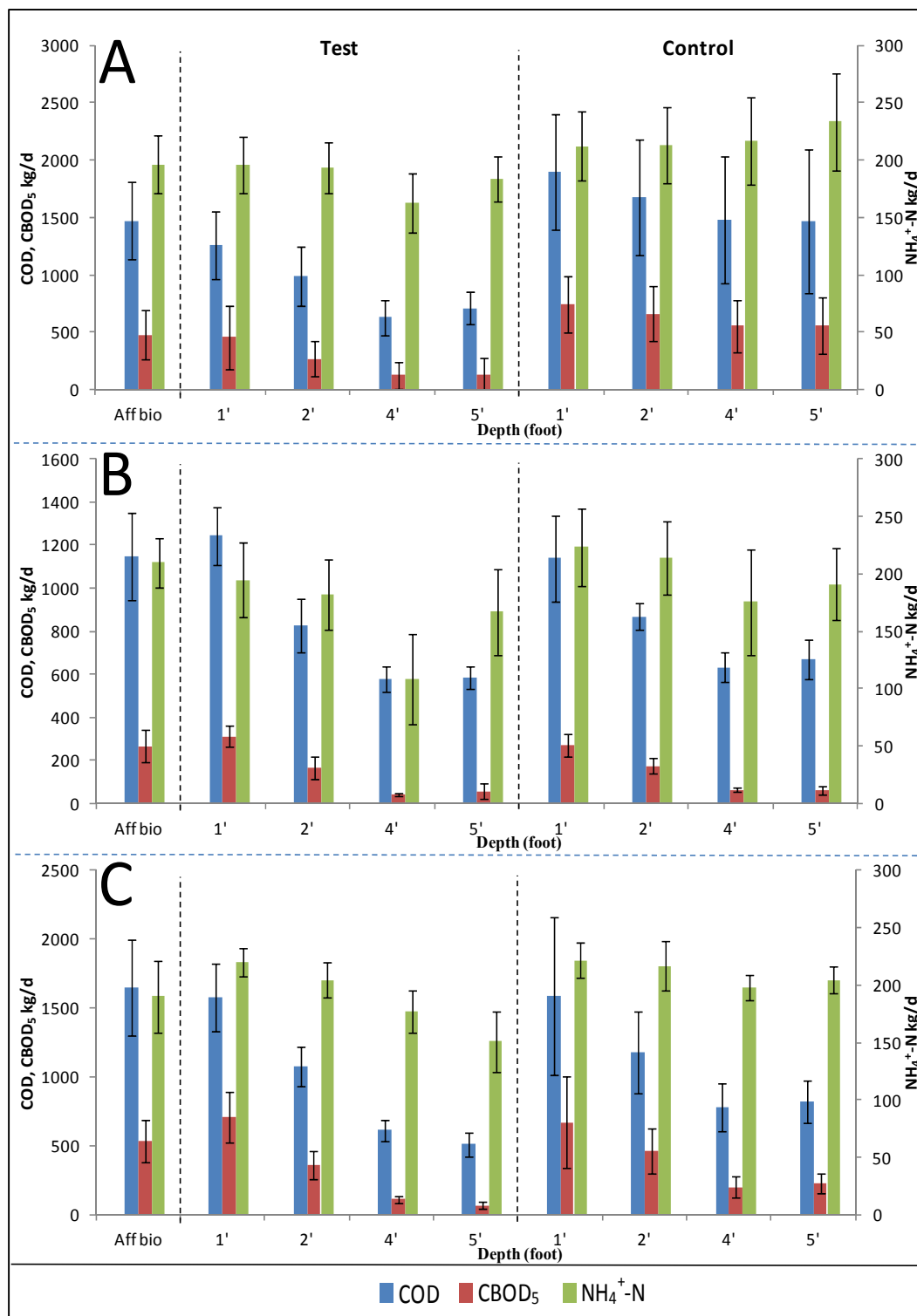


Figure 4.3 Results of physico-chemical (COD, CBOD₅, NH₄⁺-N) under testing conditions

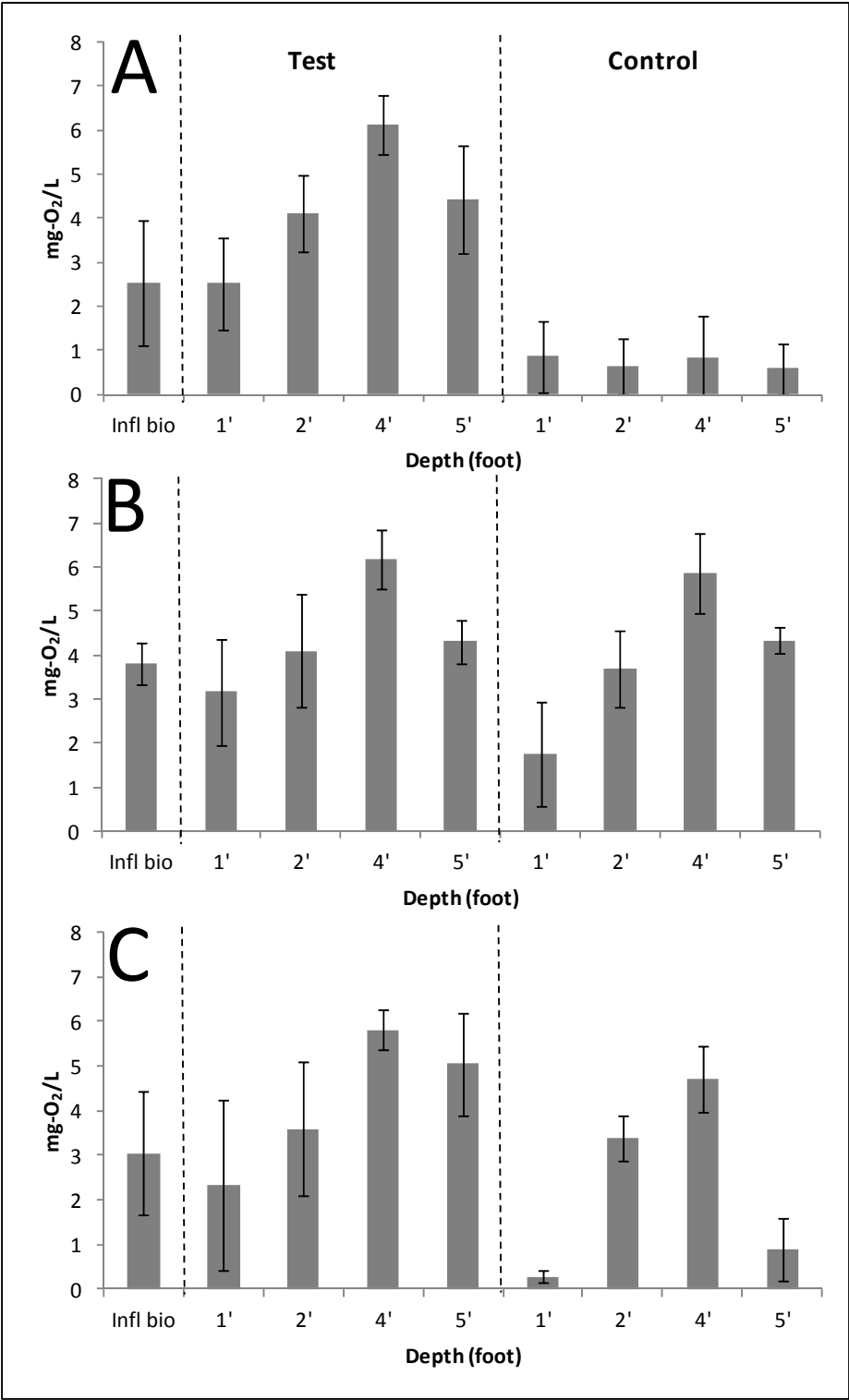


Figure 4.4 Results of dissolved oxygen (mg/L) under testing conditions

Figure 4.3 shown in (A) was obtained under aerobic testing condition (mean on 42 days), in (B) under backwashing testing condition (mean on 31 days) and in (C), under inflow testing condition (mean on 43 days). Details of these testing conditions can be found in the Material and Methods section. Each graph is separated in test and control section. Physico-chemical analysis presented is COD (chemical oxygen demand), CBOD₅ (5-days carbonaceous biochemical oxygen demand) and NH₄⁺-N (ammonia nitrogen). Statistical analysis was performed with a level of confidence of 90 and 95 %.

Figure 4.4 show results of dissolved oxygen throughout the filter test and control cell during (A) the aerobic condition (mean on 42 days), (B) backwash testing condition (mean on 31 days) and (C), during inflow testing conditions (mean on 43 days). Data was collected twice a week to produce the mean.

4.4.2 Nitrifying and total bacteria analysis

Data on **aerobic conditions** for the test cell (Figure 4.5-A), indicate that AOB populations within the biofilm were significantly more enriched at a depth of 4 and 5 feet than in the control cell, with values between 0.0095 to 0.013 % for the test cell and 0.004 to 0.008 % for the control cell. Data on the relative NOB population showed that they are generally present at significantly higher levels in the test cell as compared to the control cell, in particular at 2, 4 and 5 feet with values ranging from 0.0009 to 0.008 % in the test cell and 0.0004 to 0.002 % in the control cell. The relatively low levels of NOB suggest a very low nitrification activity in the biofilters. However, as indicated above, 17 % of NH₄⁺-N was removed in the lower portion of the test cell. Each test and control cells were operated continuously under test conditions for 5 weeks prior to sampling. Despite this, the biofilm in the control cell was able to maintain AOB and NOB populations, even though the conditions were theoretically not suitable for these bacteria due to the lack of oxygen. These results support the fact that the fixed biomass is an effective and resilient biofilm structure. Indeed, BAFs display an advantage in the attachment of nitrifiers which allowed them to survive until better growth

conditions (Bovender et al. 1990). However, an activity test would be required to confirm the viability of the AOB/NOB presence detected.

Data on **modified backwash parameters** (Figure 4.5-B) show a significant increase in the AOB relative population throughout the lower part of the media bed between the test (maximum value of 0.032%) and control cell (maximum value of 0.019 %). The highest values were observed at a depth of 4 and 5 feet in the test cell. Data on the relative NOB population showed a significant difference at a depth of 4 and 5 feet between the test and control cell. The highest value in the test cell was reached at 4 feet with NOB making up 0.008 % of the bacterial population and 0.004% of the control cell. In contrast, the progression of the relative NOB population in the control cell was almost negligible, except at 4 feet which represents the point where there is the most intense degree of aeration in the filter bed. Maximum $\text{NH}_4^+\text{-N}$ removal was observed at a depth of 4 feet, with values of 49 and 16 % in test and control cell, respectively. These results indicate a positive response to the modified backwash conditions for the development of nitrifying bacterial populations and, consequently, the removal of ammonia.

Data on **inflow adjustment** conditions resulted in unexpected observations (Figure 4.5-C). The relative AOB populations in both the test and control cells appeared to stabilize between 0.020 and 0.034 %. The relative abundance of AOB at 4 feet depth of the test cells was 0.01 % for the aeration assay, 0.032 % for the modified backwash parameter and 0.034 % for the inflow restriction assay. Data on relative NOB population show a significant difference between the lower parts (4 and 5 feet) of the test cell as compared to the control cell. Maximum relative NOB abundance for the test cell at 4 and 5 feet was 0.18 % and 0.16 %, compared to 0.042 % and 0.047 % for the control cell. The maximum values were reached at a depth of 1 foot with the NOB population making up 0.10 % of the bacterial population. These surprising data with regards to the NOB population under inflow adjustment condition, as compared to the other testing conditions, may be due to a slight increase in the wastewater temperature. The temperature monitored over the biofilters was at 17°C, 15.8°C and 18.3°C for aeration, modified backwash and inflow adjustment conditions.

The data indicated a statistical difference ($P \leq 0.1$), between the temperature of the inflow adjustment and the modified backwash assays.

Each graph in Figure 4.5 is separated in test and control section. Nitrifying bacteria analysis was the evaluation of the relative presence of AOB (ammonia oxidizing bacteria) and NOB (nitrite oxidizing bacteria). Graph shown in **(A)** was obtained under aerobic testing condition (mean on 42 days), in **(B)** under backwashing testing condition (mean on 31 days) and in **(C)**, under inflow testing condition (mean on 43 days). Statistical analysis was performed with a level of confidence of 90 and 95 %.

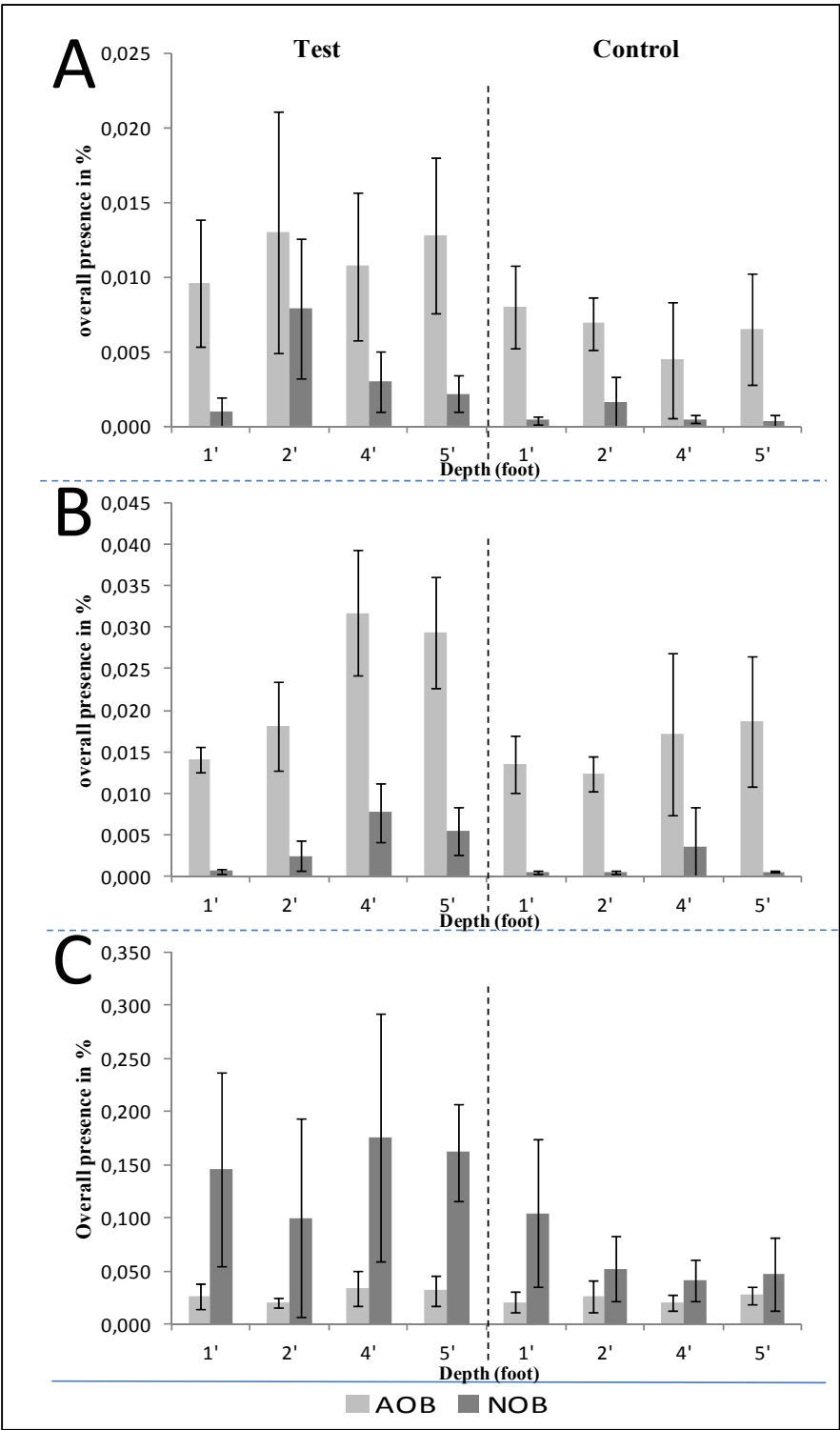


Figure 4.5 Results of relative overall presence of nitrifying bacteria (% AOB and % NOB) in the biofilm under testing conditions

4.5 Discussion

Results from the three conditions tested indicate an improvement in the treatment under each condition with regards to organic load and nitrification. There were few notable differences in the relative presence of total bacterial population within the biofilm sample between the upper and lower regions of the test cells in the different assays. This represented between 15 and 20 % of the entire biofilm (Figure A.1). However, the relative nitrifying subpopulation of bacteria within the overall bacterial population was increased.

4.5.1 Relation between relative % of nitrifying bacteria and process yield

Results shown in Figure 4.3 and 4.5 indicated that the relatively small population of nitrifying bacteria within the fixed biofilm was sufficient to produced quantifiable changes in nitrification. As shown in Figure 4.4, the lowest and highest relative AOB population observed in the test cells was 0.010 % (Figure 4.5-A, aerobic conditions at 1 foot) and 0.034 % (Figure 4.5-C, inflow adjustment at 4 feet) of the relative presence of total bacterial population. Maximum nitrification rate was noted when the AOB population reached 0.032 % of the total bacterial population (Figure 4.5-B; testing cell; modified backwash parameters at 4 feet). When this situation occurred, the relative bacteria population was composed of 0.008 % NOB within the biofilm and had an increased nitrification rate of 49 % removal between the top of the cell and at a depth of 4 feet. At the maximum NOB peak of growth (Figure 4.5-C; testing cell; inflow adjustment at 4 feet), a relative NOB population of 0.18 % was observed. This represents approximately 23 times more NOB as compared to the population levels observed with the modified backwash parameters. However, the AOB population was estimated at 0.034 % of the total population within the biofilm and the nitrification rate evaluated at 21 % as compared to 49 % nitrification in the backwash test. These results suggest that the NOB population is not strictly dependent on nitrification for growth and that the higher percent population is not directly associated with better nitrification. In accordance with a previous study (Chandran & Smets, 2000), these results suggest that the nitrification process is mainly controlled by the AOB rather than the NOB.

4.5.2 Effect of Aeration on overall treatment and nitrifying community

Aeration is critical for the proper operation of biological aerated filters (BAF). Too much air produces overgrowth on the biofilm and therefore a premature clogging of the filter; not enough air leads to the development of anoxic zones within the filter thereby significantly reducing the treatment performance (Gerardi, 2006; Mendoza-Espinosa & Stephenson, 1999). Tests on aeration (3000 m³/h) in one biofilter showed a significant improvement of wastewater treatment in the test cells as compared to control cells (Figure 4.3-A) as test cells displayed a better reduction rate of COD and CBOD₅.

The biofilm assay results indicate the presence of nitrifying bacteria at all depths sampled. From an engineering perspective, the presence of a particular functional group of bacteria in the treatment reactor, instead of population build-up, may be sufficient for nitrification (de Beer & Muyzer, 1995). However, our results indicate that the increase in nitrifying bacterial population composition within the whole biofilm in the aerated cell is correlated with NH₄⁺-N treatment efficiency. The relative nitrifying population present in the biofilter is different from those reported by other studies on wastewater treatment systems using a mixed liquor solid suspension process (Dionisi et al., 2002; Harms et al., 2003). Dionisi et al. (2002) reported that AOB made up 0.0033 % and NOB 0.39 % of the total bacteria in their WWTP study while Harms et al. (2003) reported 1.7 % AOB and 8.6 % NOB. In the present study, the highest levels of AOB and NOB were 0.013 % and 0.008 % respectively (Figure 4.5-A). Even though these levels were relatively low, they were able to decrease NH₄⁺-N by 17% in the test cell. Still if nitrifying bacteria were present in the control cell, no nitrification was observed. Instead, increases of N-NH₄⁺ observed can be explain by possible ammonification of urea with the residual dissolved oxygen or the action of denitrifying bacteria. However, the testing conditions were not suitable to gain an efficient treatment in the control cell due to the lack of O₂ (Figure 4.4-A). Indeed, COD and CBOD₅ removal in the control cell was very limited with a COD reduction of 0.4 % and an increased CBOD₅ of 16 %. Graham et al. (2007) reported that NOB bacteria are more susceptible to unsuitable conditions such as low O₂ concentrations, pH under 6.5 (Claros et al., 2013; Jiménez et al., 2011), inhibitory

compounds and temperature, which may explain the low NOB abundance obtained in our aeration experiments. Several studies have reported that the NOB population is dominant relative to the AOB population for functional nitrification (Daims et al., 2000; Dionisi et al., 2002; Gieseke et al., 2003; Harms et al., 2003). Our results, however, indicate a higher AOB population as compared to the NOB population when the nitrification process is not fully functional. However, the fact that nitrifying bacteria were still present in the control cell after more than 5 weeks without oxygen input was unexpected.

4.5.3 Effect of shorter and more frequent backwash on overall treatment and nitrifying community

Feng and al. (2017) have recently reported the effect of backwashing on microbial community structure at a genus level. However, there remains a lack of information regarding these effects on the development of specific microbial populations and their importance for treatment efficiency. Modifying the backwash experimental conditions to shorter cycles appears to have a beneficial impact on the $\text{NH}_4^+\text{-N}$ treatment. It was thought that the backwash was mainly an unclogging mechanism used periodically or when preset head pressure was decreased (Mendoza-Espinosa & Stephenson, 1999). A recent study reported improved biofouling control of backwashing to increase the filtration time, regardless of the wastewater treatment recovery and the effect on microbial community structure (Hasnain et al., 2017). However, our results showed that a less intense backwash will, over time, improve the treatment quality with an increased removal of $\text{NH}_4^+\text{-N}$, particularly in the deeper portion of the cell. Ammonia removal was increased at both the 4 and 5 foot mark in the test cell, although the higher efficiency was observed at 4 feet. The decreased efficiency observed of the $\text{NH}_4^+\text{-N}$ treatment from the 4 to the 5 foot depth may result from the lack of uniformity or preferential current of the water down-flow which can induce slight changes in water parameters such as nutrient loading rate of N-nitrogen or faster inflow rate (Metcalf & Eddy, 2014).

The relative presence of nitrifiers within the test cells increased throughout the treatment. This supports the notion that a less intense backwash maintains the bacterial population and

allows the relative population to expand. This happens primarily in relation to the depth of the media bed as we have noted no significant changes in the % AOB and NOB between the test and the control cell in the shallow portion of the media bed. A gradual increase in AOB and NOB populations in the test cell from the upper part to the lower part of the media bed was observed. This contrasts the control cell where no significant increases were observed. Likewise, Feng and al. (2017) reported a decrease in the relative presence of the majority of microbial genus in the lower part of the cell.

4.5.4 Effect of reduced inflow rate on overall treatment and nitrifying community

Decreasing the flow rate by approximately 36 % through the test cell allowed the percent NOB population to significantly increase. Furthermore, the increase in the relative population of NOB was much higher in the reduced inflow rate assay than the results obtained in either the aeration or modified backwash parameter assays. This supports the notion that NOB appear to be the dominant nitrifying bacterial population, in particular when environmental conditions are favorable for their development (Daims et al., 2000; Dionisi et al., 2002; Winkler et al., 2012), such as the contact time between the wastewater and the biofilm. However, the presence of *Nitrotoga* that can achieved nitrification at low dissolved oxygen could partly explain the increases of NOB over AOB (Keene et al., 2017). It should be noted that the relative AOB population did not significantly change between the test and the control cell in this assay. Changes in the relative populations of AOB and NOB did not result in altered rates of nitrification, which was unexpected (Figure 4.3-**B** and **C**).

The test conditions show relatively little variation between control and test cells on the overall bacterial population within the biofilm (ANNEXE I). This means that observed differences in NOB population was not associated to the overall bacterial population. This suggests that the presence of NOB do not rely exclusively on nitrification for growth. It has been shown by Koch et al. (2015) and by Daims et al. (2015) that NOB specific strains of *Nitrospira* (*moscoviensis* and *inopina*) can metabolize urea into ammonium and sustain complete nitrification in the presence of O₂. This may have a direct influence on the rates of

nitrification when the NOB population is dominant in a nitrifying biofilm because of the additional $\text{NH}_4^+\text{-N}$ that may be supplied by *Nitrospira spp.* Winkler et al. (2012) also tried to explain the disproportion of the NOB population relative to the AOB population in aerobic granular sludge by a nitrite loop hypothesis where nitrite oxidation/nitrate reduction by denitrifiers supply the NOB in nitrite independent of AOB. With lower loading rate (inflow restriction assay), this could mean lower N-NH_4^+ to be oxidized for NOB. In this case, NOB can produce by themselves the ammonification of urea. This N-NH_4^+ can be oxidized by NOB (comammox) reducing by the same way the N-NH_4^+ available for the AOB and producing the nitrite independent from AOB. If denitrifiers are present, then the reciprocal feeding may happen. This may be occurring on a fixed biofilm and may partly explain our present results. It is difficult to estimate the nitrification rate based on the population of nitrifying bacteria, as the $\text{NH}_4^+\text{-N}$ is consumed/oxidized by the AOB at the same time as it is supplied by the reverse metabolic pathway by certain NOB species. This may result in a misinterpretation of the nitrification rate. Furthermore, the decreased flow rate increased the removal of both COD and CBOD_5 with lowest values observed in this study for these parameters, but did not reach the expected levels of nitrification. Our observations lead us to hypothesize that in order to sustain a good nitrification rate in this type of process, and if the presence of AOB is to be improved at the same time as that of NOB, the washing conditions must be modified, the flow rate reduced and the process subjected to sustained aeration.

4.6 Conclusion

The study shows that modifications in environmental conditions related to sustained aeration, modified backwash parameters and decreased flow rate on a treatment cell can increase the efficiency of wastewater treatment. This improved efficiency was not directly correlated with increased nitrifying bacteria, and in particular the relative NOB population, in the biofilter. We suggest the possibility of maximizing the nitrification process while reducing biomass by limiting the metabolic pathway for NOBs. This modification to the operating procedure of the WWTP could upgrade the efficiency of the biofilter to increase ammonia removal as well as decreasing COD and CBOD_5 effluent concentrations.

CHAPITRE 5

ARTICLE 3 : APPROCHES OPÉRATIONNELLES POUR FAVORISER LA NITRIFICATION DANS UN BIOFILTRE AÉRÉ À FLUX DESCENDANT

François-René Bourgeois¹, Frédéric Monette¹

¹STEPPE – Station Expérimentale des Procédés Pilote en Environnement, École de technologie supérieure, Département de Génie de la Construction, 1100 rue Notre-Dame Ouest, Montréal, Québec, Canada H3C 1K3

Soumis pour publication le 19 avril 2018 et accepté le 14 octobre 2018 à la *Revue canadienne de génie civil*

5.1 Résumé

Avec le resserrement des exigences réglementaires relatives à l'azote ammoniacal, plusieurs stations d'épuration doivent réduire leur charge azotée rejetée. Dans l'objectif de favoriser la nitrification d'un filtre biologique Biocarbone®, des essais d'aération, de modifications des paramètres de lavage et de réduction du débit ont été réalisés. Le suivi a été réalisé à différentes profondeurs dans le média filtrant. Les résultats montrent que l'oxygène dissous doit être d'au moins 6 mg-O₂/L pour favoriser la nitrification dans la partie profonde du filtre. Des enlèvements en DCO, CDBO₅ et N-NH₄⁺ de 89 et 95 et 38 % ont été respectivement obtenus, tandis que la consommation supplémentaire d'énergie a été évaluée entre 69 et 407 kWh/d par kg de CDBO₅ et N-NH₄⁺ enlevés. Les résultats suggèrent que l'aération constitue un paramètre-clé pouvant être partiellement contrôlé par le temps de rétention hydraulique, combiné à des lavages plus courts et fréquents stimulant davantage les bactéries nitrifiantes.

Mots clés : filtre biologique, biofiltration, cultures fixées, biofilm, nitrification, aération, lavage à contre-courant, temps de rétention hydraulique.

5.2 Introduction

L'azote ammoniacal en milieu aqueux, et en particulier sous sa forme N-NH_3 , peut contribuer à une toxicité chronique et aigüe pour l'environnement, ce qui explique qu'il est sujet à un contrôle au niveau des rejets des eaux usées (Driscoll et al., 2003; Satin, 2006; Camargo & Alonso, 2006). Au Canada, le rejet d'azote ammoniacal sous la forme non ionisée N-NH_3 est règlementé à raison d'une concentration ne devant pas dépasser 1,25 mg $\text{N-NH}_3/\text{L}$ à l'effluent (Environnement Canada, 2012). L'enlèvement de l'azote ammoniacal des eaux usées municipales se fait généralement par le processus biologique de nitrification. Ce processus a été largement étudié et est employé dans plusieurs systèmes de traitement biologique (Environnement Canada, 2003; Daims & Wagner, 2010), particulièrement ceux de types biomasse en suspension. Cependant, des lacunes subsistent quant aux performances de nitrification (et aux processus impliqués) à pleine échelle sur des systèmes de type biomasse fixée. Les croissances de type « biomasse fixée » sont ceux les plus couramment rencontrés dans les milieux naturels, car c'est la façon privilégiée qu'on les bactéries de croître (Jefferson, 2004). L'intérêt pour les systèmes de traitement à biomasse fixée connaît un récent essor étant donné le fait que ces procédés sont plus résistants et résilients face aux stress environnementaux tels que les chocs toxiques ou les variations dans la disponibilité des nutriments (Chen et al., 2006; L. Metcalf et al., 2004). De plus, ces systèmes peuvent générer d'excellent taux de nitrification (Chen et al., 2006).

Les systèmes de filtration biologique à culture fixée sont reconnus pour leur efficacité quant au traitement de la charge azoté dans les eaux usées (Cohen, 2001). Ces procédés, lorsqu'employés pour le traitement de l'azote, s'intègrent généralement en traitement secondaire ou tertiaire de la filière d'assainissement (Barjenbruch, 2007; Paffoni, Gousailles, Rogalla & Gilles, 1990; Payraudeau, Paffoni & Gousailles, 2000; Pujol, Lemmel & Gousailles, 1998; Rocher et al., 2007; Tallec, Garnier & Gousailles, 2006). Ils sont préalablement conçus pour répondre à ce besoin. Or, au Canada, la majorité des stations d'épurations en place utilisant les premières générations de BAF n'ont pas été conçues pour le traitement de l'azote ou n'ont pas atteint les performances anticipées en raison de divers

problèmes opérationnels. Ces unités de traitement nécessitent une mise à niveau en raison des nouvelles exigences d'enlèvement de l'azote. Les présents travaux de recherche proposent ainsi une approche opérationnelle originale favorisant le traitement biologique afin d'atteindre les nouvelles exigences de traitement. Cette approche présente l'avantage d'être réalisé sur le terrain à pleine échelle et procure ainsi une réponse rapide au niveau du traitement selon les conditions réelles des eaux usées rencontrées en station.

Différents travaux, résumés par Vigne (2007), à échelle laboratoire, semi-industrielle et industrielle ont été effectués au courant des dernières années afin d'étudier les différents éléments pouvant influencer la nitrification dans divers procédés de biofiltration. Ces études ont été réalisées pour la plupart avec des billes de polystyrènes comme matériau support. Seulement deux des travaux ont été portés sur des biofiltres dont la nature du matériau support était du schiste expansé, et cela à échelle laboratoire (Ohashi et al., 1995) et échelle semi-industrielle (Fruhen et al., 1994). De ces travaux, il en ressort que de nombreux facteurs qu'ils soient physiques, environnementaux ou opératoires, affectent la performance des biofiltres nitrifiants. Tel que présenté par Boller et al. (1994), ils peuvent être divisés en deux catégories : échelle microscopique (nature du biofilm) et échelle macroscopique composée de paramètres décrivant la configuration du réacteur biologique. Parmi les paramètres caractérisant la configuration du réacteur biologique, l'on retrouve notamment l'hydraulique du réacteur (HRT), la méthode d'aération et l'érosion du biofilm résultant des cycles de lavages. Il est toutefois à noter que toutes ces études ont été faites à partir de biofiltres en traitement tertiaire, configurés pour l'enlèvement de l'azote. La question demeure entière concernant un réacteur biologique en traitement secondaire et non conçu pour la nitrification.

Dans un contexte d'étude à échelle industrielle, les stations d'épurations ont peu de marge de manœuvre pour tester différents paramètres opérationnels et en observer les effets. Toutefois, il est possible d'observer les effets de l'injection d'air de procédé (Boller et al., 1994; Zhao et al., 2006), d'une modification sur les paramètres de lavages des filtres (Boller et al., 1994; Ohashi et al., 1995) ainsi que d'une variation de la charge hydraulique sur les cellules de traitement (Canler et al., 2003; Tschui et al., 1994), sans altérer l'intégrité du réacteur

biologique. Tous ces paramètres ont une influence potentielle connue sur le rendement (Gullicks et al., 2011; Pramanik et al., 2012). Cependant, des zones d'ombres subsistent quant à savoir si l'ensemble de ces paramètres est en mesure de favoriser l'aspect biologique du traitement jusqu'à l'apparition du phénomène de nitrification dans une unité de biofiltration non conçue pour ce processus.

Ainsi, les présents travaux portent sur l'étude approfondie d'un biofiltre à flux descendant en traitement secondaire soumis à différentes conditions expérimentales visant à favoriser la nitrification. Cette approche novatrice développée sur la base d'analyse d'études antérieures n'a encore jamais été effectuée à pleine échelle et présente comme objectif de démontrer s'il est possible, par des changements opérationnels réalisés en station, de favoriser le développement de conditions propices à une nitrification biologique au sein du procédé de type biomasse fixée non prévu à cet effet. Les résultats obtenus pourront alors avoir une portée significative pour les stations d'épuration biologiques de type biofiltration dont une mise à niveau s'avère nécessaire.

5.3 Matériels et méthodes

5.3.1 Description de la station d'épuration et caractéristiques des eaux usées

Les essais expérimentaux ont été menés à la station d'épuration municipale (STEP) d'Auteuil (Ville de Laval, Québec, Canada) basée sur un procédé de filtration biologique. L'apport moyen d'eaux usées (33 000 m³/d) est réparti de manière égale sur deux biofiltres aérés, submergés à courant descendant de type Biocarbonate® (OTV) (biomasse fixée). Comme le montre la Figure 5.1, chaque biofiltre est composé de 10 cellules de traitement d'une profondeur de 1,8 m de « Biodagen » (schiste expansé de la taille d'un grain avec un diamètre nominal de 3 à 6 mm). Chaque cellule de traitement s'ouvre (mode de filtration) ou se ferme (mode d'attente) en fonction du débit d'entrée d'eau et fonctionne en rotation dans le biofiltre. En mode filtration, et avec une cellule en lavage dans le biofiltre, la charge hydraulique superficielle prévue sur chaque lit de média filtrant (cellule de traitement) varie normalement de 4,8 à 9,4 m³/m²/h (temps de filtration de 22,5 et 11,5 min) avec un débit

maximum à l'entrée de 33 000 à 65 000 m³/d. Les données expérimentales ont montré une charge hydraulique moyenne à l'entrée des cellules de traitements de 7 m³/m²/h (temps de filtration de 15,4 min) pendant la durée de l'étude. Deux cellules côte à côte (représentées en vert à la Figure 5.1) ont été sélectionnées à partir de chaque biofiltre, à l'exclusion de celles qui étaient les plus proches du point de distribution d'eaux usées. Les eaux usées étaient principalement de type résidentiel (domestique), avec une température moyenne et un pH de $18,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ et $6,8 \pm 0,3$ respectivement durant les périodes d'essais et d'échantillonnage. Cette station d'épuration n'était pas en mesure de maintenir une quelconque nitrification biologique avant le début de l'étude.

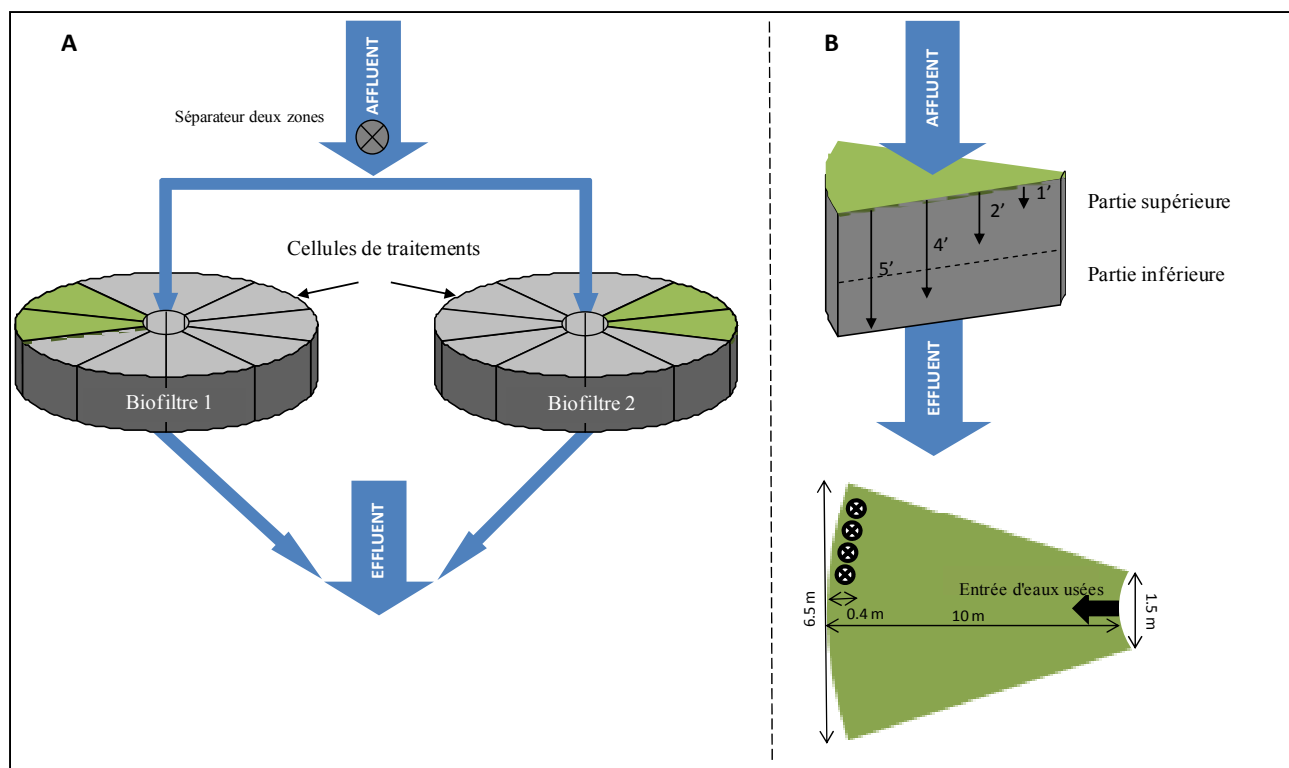


Figure 5.1 Plan détaillé des biofiltres, d'une cellule de traitement ainsi que des points d'échantillonnages pour l'eau usée et le schiste

La Figure 5.1 présente un plan détaillé en (A), des biofiltres avec les cellules de traitements (en gris) et les cellules sélectionnées pour les essais (en vert) ainsi que la distribution de l'eau et en (B), une vue en coupe du lit filtrant avec les points

d'échantillonnage des grains de schiste et des eaux usées en fonction de la profondeur : 1' (0,3 m), 2' (0,6 m) présenté comme la partie supérieure de la cellule, 4' (1,2 m) et 5' (1,5 m) présenté comme la partie inférieure de la cellule. Le lit filtrant est composé de grains schistes expansés d'un diamètre nominal variant de 3 à 6 mm et présente une hauteur totale de 6' (1,8 m). La cellule de traitement présentée à la Figure 5.1 est représentative de toutes les autres cellules de traitement sélectionnées pour la réalisation des essais.

5.3.2 Conditions expérimentales

Trois conditions expérimentales différentes ont été évaluées sur une période de trois années. **1. Conditions d'aération** dans lesquelles 3000 m³/h d'air de procédé ont été injectés à travers le biofiltre testé, tandis que dans le biofiltre de contrôle, aucun air de procédé n'a été injecté. **2. Modification des paramètres de lavage à contre-courant.** Les paramètres de lavage à contre-courant ont été modifiés pour les cellules dans le biofiltre testé selon les caractéristiques suivantes : procédure de décolmatage pendant 2 minutes avec une injection d'air seule, puis lavage à contre-courant avec injection d'eaux et d'air pendant 6 minutes puis rinçage à l'eau seule pendant 1 minute (9 min totales); la durée de filtration maximum entre les lavages à contre-courant a été fixée à 12 heures. Les biofiltres de contrôle ont suivi la même procédure, sauf que la durée du lavage à contre-courant (air + eau) a été fixée à 11 minutes (au lieu de 6 minutes), et ce, suivant une durée de filtration entre les lavages de 16 heures (au lieu de 12 heures). La programmation de rotation des cellules en attente du biofiltre Biocarbonate® a été fixée à 30 min dans les cellules tests et de contrôles. **3. Ajustement du débit sur les cellules de filtration.** L'ouverture permettant l'entrée d'eaux usées a été limitée à 2,3 m² (cellule test) au lieu de 10,1 m² (cellule contrôle). Il convient de noter que l'afflux d'eaux usées dans la goulotte de distribution était rarement au maximum de la capacité. Cette restriction a provoqué une réduction moyenne de 36 % du débit normal d'eaux usées et provoque une durée moyenne de filtration de 21 min (les témoins ne présentaient aucune restriction et affichaient un temps de filtration moyen de 15,4 min). La charge en nutriment a ainsi été réduite dans les conditions restreintes (cellule test). L'air de

procédé a été maintenu à 3000 m³/h pendant les essais de modification des paramètres de lavage à contre-courant et d'ajustement du débit.

Les cellules de traitements des biofiltres ont été sélectionnées afin de définir les paramètres opérationnels qui offre le maximum d'impact sur l'élimination de l'azote ammoniacal. Les conditions aérobies et les paramètres modifiés de lavage à contre-courant ont permis de comparer les résultats d'un biofiltre (test) à l'autre (contrôle) tandis que les essais sur l'ajustement du débit comparaient une cellule de traitement (test) avec une cellule adjacente (contrôle). Pour chaque condition d'essai, une période de conditionnement minimale de cinq semaines a été respectée avant l'échantillonnage des eaux usées.

5.3.3 Échantillonnage des eaux usées et analyses physico-chimique

Les eaux usées ont été échantillonnées à l'aide d'une pompe péristaltique Easy-load® (Masterflex®, modèle 7518-60) avec un tube LS-15 Masterflex®, conformément aux méthodologies proposées par le Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Ministère de l'Environnement du Québec (CEAEQ-MDDEFP) (Figures 5.1 et 5.2). Le protocole impliquait un échantillonnage proportionnel au temps avec un taux de prélèvement de 1 litre par heure pour composer un seul échantillon en 14 heures. L'échantillon a été maintenu à 4°C dans une bouteille de polyéthylène. Les eaux usées ont été échantillonnées deux fois par semaine à chaque profondeur d'échantillonnage. Le Tableau 5.1 montre les paramètres physico-chimiques suivis au cours de l'étude, leurs limites de détection analytique respectives (LOD) et les méthodes de référence (WEF & APHA, 2012). Chacun des essais réalisés a conduit à l'obtention d'un nombre d'échantillons « n » se situant entre 5 et 10 pour chaque paramètre analysé. Le débit d'eaux usées pour chaque biofiltre a également été enregistré lors des essais, car il influence directement la charge en nutriments et le taux de filtration.

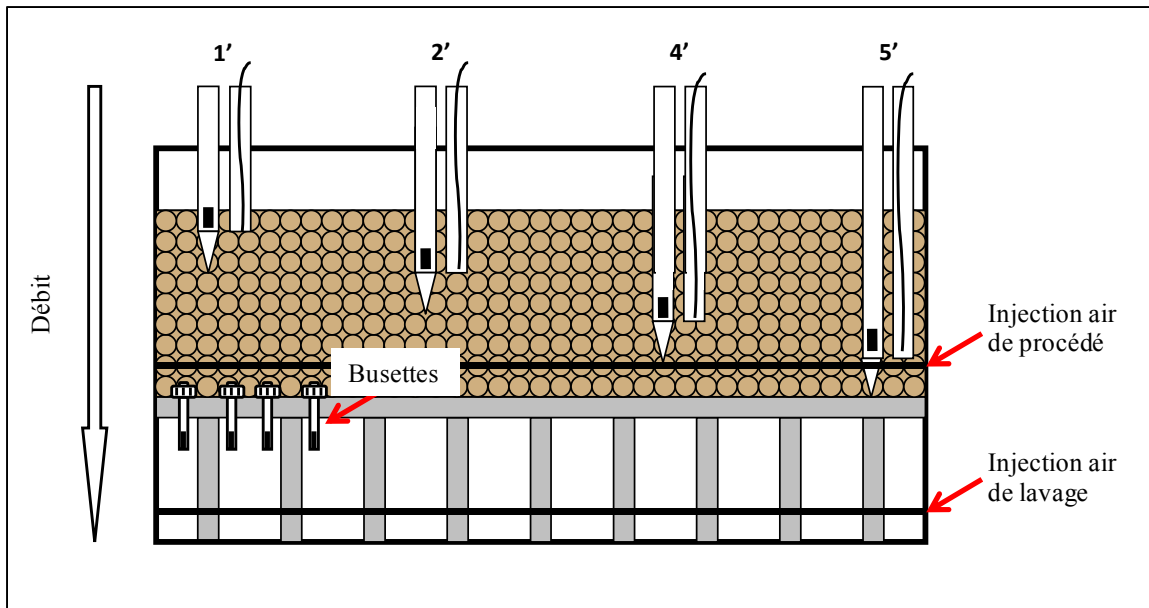


Figure 5.2 Vue sectionnelle d'une cellule de traitement avec les points et l'équipement d'échantillonnage de schiste et d'eau usée

La Figure 5.2 présente une vue sectionnelle d'une cellule de traitement avec les installations d'échantillonnage des grains de schistes et de l'eau usée. Le massif est supporté par un faux plancher incorporé de busettes en plastiques (au nombre de 2500, soit environ 62 busettes/m²) permettant de collecter les eaux traitées ainsi que de distribuer l'eau et l'air de lavage. L'eau usée a été prélevée par une pompe péristaltique Easy-load®, Masterflex® modèle 7518-60 (non présenté) avec un tube LS-15 Masterflex®.

Tableau 5.1 Paramètres physico-chimiques suivis et limite de détection

Paramètres de pollution	Unité	LOD	Références Standard Methods
DCO	mg/L	16.0	SM 5220
DBO ₅ C	mg/L	1.0	SM 5210
N-NH ₄ ⁺	mg/L	1.0	SM 4500-NH ₃
NT	mg/L	0.02	MA.303-nutrient
N-NO ₃ ⁻	mg/L	1.0	SM 4500E-NO ₃ ⁻
Alcalinité totale	mg/L	4.0	SM 2320
OD	mg/L	0.01	SM 4500-O
Sulfures	µg/L	5	SM 4500-S ² -D

SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (WEF & APHA, 2012); **LOD:** limite de détection; DBO₅C; demande biochimique carbonnée en oxygène incubé pendant 5 jours at 20°C ± 1°C.

MA: CEAEQ méthode analytique

5.3.4 Analyses statistiques

Pour déterminer s'il y avait des différences significatives entre les paramètres physico-chimiques dans les cellules tests et de contrôles, des analyses statistiques ont été effectuées en utilisant un test F et un test t de Student unidirectionnel. L'intervalle de confiance statistique a été fixé à $p \leq 0,05$.

5.4 Résultats

5.4.1 Conditions d'aération

La Figure 5.3 présente les résultats de DCO, de CDBO₅, de N-NH₄⁺, d'oxygène dissous, de NTK et de sulfures des essais de modifications des conditions d'aération (cellule test vs cellule de contrôle) à l'affluent du biofiltre et à 1', 2', 4' et 5' de profondeur. Les résultats de la Figure 5.3-A montrent une amélioration significative (intervalle de confiance de 95 %) du

traitement dans la cellule test concernant l'enlèvement de la DCO ainsi que de la CDBO₅. En effet, des enlèvements totaux respectifs de 55 % (DCO) et 81 % (CDBO₅) ont été globalement observés sur toute la profondeur de la cellule test, comparativement à une dégradation ou un enlèvement négligeable observé dans la cellule de contrôle, soit une hausse de 5 % (DCO) et une baisse de 15 % (CDBO₅) respectivement. La cellule de contrôle, quant à elle, montre peu d'amélioration au niveau de l'enlèvement de la CDBO₅ avec un enlèvement global de 15 % avec la présence d'une dégradation dans la partie supérieure (1'; + 14 %) par rapport à l'eau affluente. Une augmentation de la DCO est également observée dans la partie supérieure de la cellule (1' et 2'; + 35 %) avec un enlèvement global négligeable sur la profondeur du biofiltre. Les résultats concernant l'azote ammoniacal pour la cellule test (Figure 5.3-B) montrent une réduction de 13 %, en lien avec l'augmentation de l'oxygène dissous, dans la partie inférieure de la cellule de traitement (spécifiquement à 4'), par rapport à l'affluent du biofiltre. À 5', les résultats observés montrent une réduction de N-NH₄⁺ de 2 % par rapport à l'affluent. Les données d'alcalinité totale (non présentées) permettent d'établir le ratio « alcalinité consommée/N-NH₄⁺ nitrifié » à 6.4 ± 2.8 mg-CaCO₃/mg-N pour les données à 4'. Ce résultat est en accord avec le ratio stœchiométrique attendu de nitrification de 7.14 mg-CaCO₃/mg-N (Metcalf & Eddy, 2014). Dans la cellule de contrôle, les données montrent plutôt une augmentation globale statistiquement significative ($P \leq 0.05$) du N-NH₄⁺ (+ 25 %). Les données d'oxygène dissous montrent une différence significative à toutes les profondeurs (1', 2', 4' et 5') entre les valeurs de la cellule test oxygénée et la cellule de contrôle non soumis à l'injection d'air de procédé. La cellule test montre une augmentation significative ($P \leq 0.05$) de l'oxygène dissous à 2', 4' et 5' de profondeur par rapport à l'affluent du biofiltre. Les augmentations observées à 2' et 5' de profondeur sont respectivement de + 1.5 et + 2.0 mg-O₂/L avec des valeurs moyennes respectives de 4.0 et 4.5 mg-O₂/L. La valeur maximale est observée à 4' de profondeur atteignant en moyenne près de 6 mg-O₂/L, soit + 3,6 mg-O₂/L par rapport à l'affluent. Pour toute la durée de l'essai, l'oxygène dissous a varié selon les profondeurs de la cellule contrôle

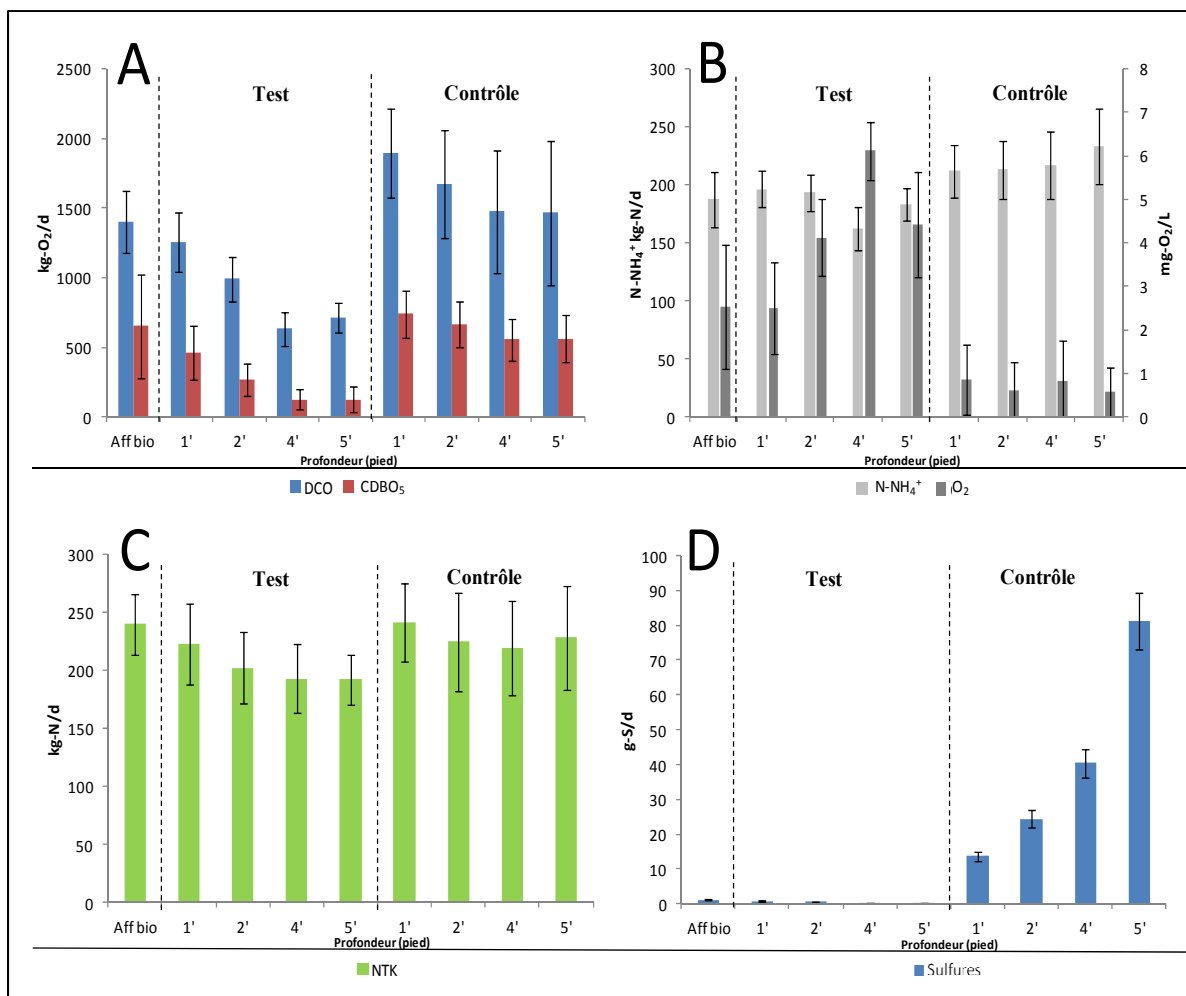


Figure 5.3 Résultats des essais sur l'aération, comparant la cellule test à la cellule contrôle

de 0,86 à 0,57 mg-O₂/L avec une valeur moyenne de 0,7 mg-O₂/L, comparativement à 2,5 mg-O₂/L à l'affluent. Les données de NTK établies avec les données de Nt et de NO₃⁻ (Figure 5.3-C) ne montrent pas de différence statistiquement significative (Student t-test; $P \leq 0.05$) entre la cellule test et la cellule de contrôle. Par contre, l'abaissement apparent à 4' et 5' par rapport à l'affluent du biofiltre (environ 50 kg/d) dans la cellule test en comparaison à la cellule de contrôle (environ 20 kg/d) porte à croire qu'il y a effectivement eu un effet de l'aération sur la concentration de NTK. Toutefois, une différence statistiquement significative ($P \leq 0.05$) entre l'affluent du biofiltre et les profondeurs de 2', 4' et 5' de la cellule test a été relevée. Finalement, les résultats des sulfures montrent un accroissement majeur selon la profondeur dans la cellule de contrôle de 14 à 81 g-S/d alors que dans la cellule test et dans

l'affluent des biofiltres, la présence des sulfures est négligeable. L'analyse des sulfures a été effectuée uniquement lors des essais sur les conditions d'aération, car la formation de H_2S n'est problématique qu'en condition d'anoxie uniquement.

5.4.2 Paramètres modifiés de lavage

La Figure 5.4 présente les résultats de DCO, de CDBO_5 , de N-NH_4^+ , d'oxygène dissous et de NTK des essais de modifications des conditions de lavage. La Figure 5.4-A montre un abaissement statistiquement significatif ($P \leq 0.05$) de la charge en DCO et CDBO_5 dans la cellule test ainsi que dans la cellule de contrôle par rapport à l'affluent des biofiltres. Les valeurs d'abattement de DCO et de CDBO_5 sont respectivement de 49 et 83 % pour la cellule test et de 45 et 77 % pour la cellule de contrôle. Toutefois, aucune différence statistiquement significative ($P \leq 0.05$) entre les performances des différentes profondeurs dans les cellules test et de contrôle n'a été relevée. En ce qui concerne la charge en N-NH_4^+ , la Figure 5.4-B montre un abattement statistiquement significatif ($P \leq 0.05$) de 49 % dans la cellule test et de 16 % dans la cellule de contrôle. Le ratio « alcalinité consommée/ N-NH_4^+ nitrifié » pour la cellule test est de 7.9 ± 2.9 mg- CaCO_3 /mg-N et de 7.0 ± 4.8 mg- CaCO_3 /mg-N pour la cellule de contrôle, soit près de la valeur théorique attendue de 7.14 mg- CaCO_3 /mg-N, confirmant la présence d'un processus de nitrification dans les deux cellules. Les résultats d'oxygène

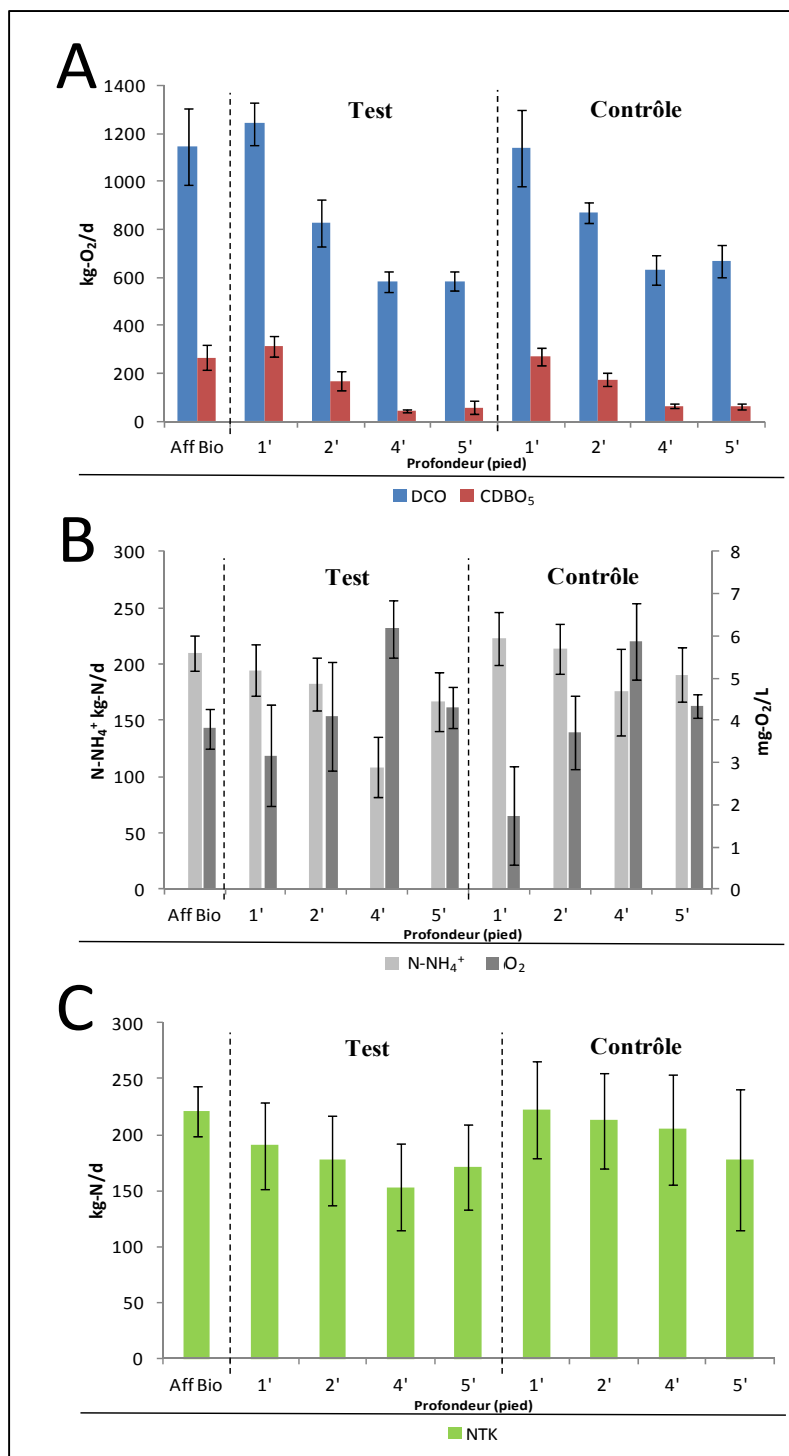


Figure 5.4 Résultats des essais sur les paramètres modifiés de lavage à contre courant, comparant la cellule test à la cellule contrôle

dissous montrent une variation statistiquement significative ($P \leq 0.05$) entre les concentrations de l'affluent des biofiltres (3,8 mg/L) et la profondeur de 4' de la cellule test (6,2 mg/L). Pour la cellule de contrôle, des variations statistiquement significatives ($P \leq 0.05$) de concentration d'oxygène dissous ont été observées à 1', 4' et 5' de profondeur par rapport à l'affluent des biofiltres. Toutefois, aucune différence significative dans les concentrations d'oxygène dissous n'a été relevée entre les mêmes profondeurs correspondantes des cellules tests et de contrôle. La valeur maximale d'oxygène dissous pour les cellules test et de contrôle est atteinte à 4' de profondeur avec des valeurs moyennes s'établissant à près de 6 mg-O₂/L. Les plus faibles valeurs d'oxygène dissous sont observées dans la partie supérieure des deux cellules de traitement (1' et 2') avec en moyenne une concentration de 3.2 mg-O₂/L, tandis que les plus fortes valeurs appariassent dans la section inférieure (4' et 5') avec une concentration moyenne de 5.2 mg-O₂/L. Les résultats de la charge en NTK (Figure 5.4-C) montrent une différence statistiquement significative ($P \leq 0.05$) uniquement entre l'affluent des biofiltres et les profondeurs 2', 4' et 5' de la cellule test, avec un pourcentage d'enlèvement atteignant près de 31 % à 4' de profondeur. Aucune différence statistiquement significative pour la cellule de contrôle n'a pu être établie, et ce, malgré la diminution de la charge en NTK de 42 % constatée à la Figure 5.4-C à une profondeur de 5'.

5.4.3 Ajustement du débit

La Figure 5.5 présente le résultat des essais sur l'ajustement du débit. Plus spécifiquement, la Figure 5.5-A montre un abaissement statistiquement significatif ($P \leq 0.05$) des charges en DCO et CDBO₅ dans la cellule test et la cellule de contrôle, par rapport à la charge de l'eau affluente des biofiltres. Les rendements observés sur toute la profondeur pour la cellule test s'élèvent respectivement à 56 % et 68 % pour la DCO et la CDBO₅, comparativement à 59 % et 69 % respectivement pour la cellule de contrôle. Toutefois, aucune différence statistiquement significative ($P \leq 0.05$) n'a été observée entre les mêmes profondeurs correspondantes de la cellule test et de contrôle pour ces deux paramètres. Les données sur

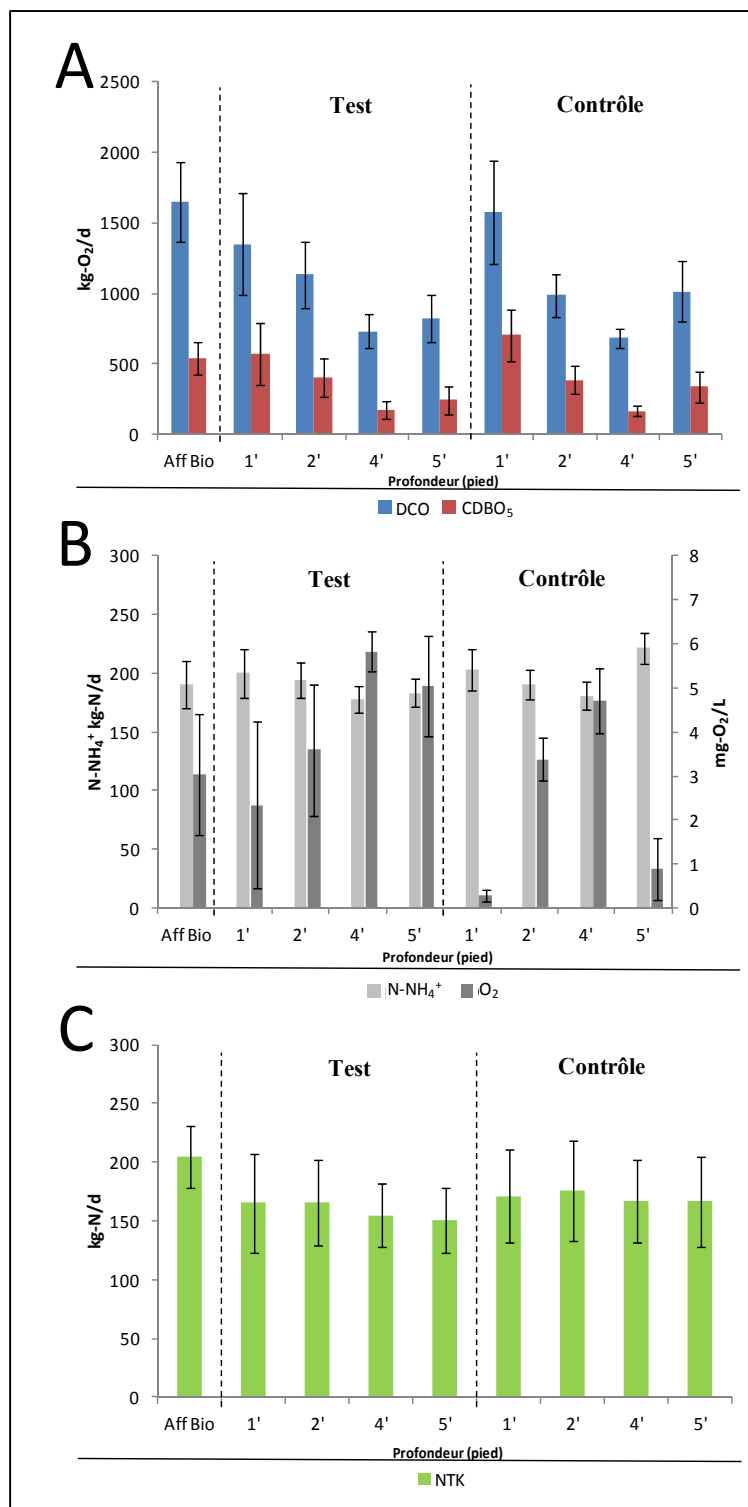


Figure 5.5 Résultats des essais sur l'ajustement du débit, comparant la cellule test à la cellule contrôle

les charges en N-NH_4^+ (Figure 5.5-B) ne montrent aucune différence statistiquement significative ($P \leq 0.05$) dans les différentes profondeurs des cellules test et de contrôle par rapport à l'affluent des biofiltres, sauf à une profondeur de 5' de la cellule de contrôle en raison d'une augmentation de 16.5 % de la charge en N-NH_4^+ . Le meilleur abattement du N-NH_4^+ se situe dans la partie inférieure de la cellule test, mais avec un taux d'abattement de seulement 6.4 %. Toutefois, le ratio « alcalinité consommée/ N-NH_4^+ nitrifié » de près de 20 $\text{mg-CaCO}_3/\text{mg-N}$ ne permet pas de confirmer la présence du processus de nitrification. Les données d'oxygène dissous montrent une différence statistiquement significative ($P \leq 0.05$) entre la concentration observée à la profondeur de 4' de la cellule test et celle de l'eau affluente du biofiltre, avec des valeurs respectives de 3.0 et 5.8 $\text{mg-O}_2/\text{L}$. Des différences statistiquement significatives ($P \leq 0.05$) en oxygène dissous ont aussi été observées en comparant les profondeurs correspondantes entre la cellule test et la cellule de contrôle à 1', 4' et 5'. Les valeurs maximales de concentrations d'oxygène dissous de la cellule test ont été observées dans la partie inférieure (4' et 5') de la cellule avec des valeurs se situant entre 5.8 et 5.0 $\text{mg-O}_2/\text{L}$. La cellule de contrôle présente de faibles concentrations en oxygène dissous à 1' et 5' de profondeur avec des valeurs respectives de 0.28 et 0.89 $\text{mg-O}_2/\text{L}$, comparativement à 3.4 et 4.7 $\text{mg-O}_2/\text{L}$ à 2' et 4' de profondeur. Quant aux valeurs de charge en NTK (Figure 5.5-C), elles ne présentent aucune différence statistiquement significative ($P \leq 0.05$) aux profondeurs correspondantes entre la cellule test et la cellule de contrôle. Les valeurs moyennes observées pour l'ensemble des profondeurs se situent respectivement à 159 et 170 kg-N/d pour les cellules test et de contrôle, soit des abattements moyens correspondants de 22 et 17 %.

5.4.4 Impacts opérationnels et estimation des coûts énergétiques

Le Tableau 5.2 résume l'ensemble des impacts opérationnels évalués lors des différents essais à l'étude. Ainsi, une évaluation de la charge polluante à l'entrée et à la sortie du biofiltre a été effectué afin de comparer l'enlèvement entre la cellule test et de contrôle. L'estimation des besoins énergétique est présentée sur la base de la CDBO_5 et du N-NH_4^+ . Les besoins énergétiques ont été évalués selon Mohapatra (2010) avec l'enlèvement de la charge carbonée

(CDBO₅) et azotée (N-NH₄⁺) à raison de 0.8 kWh/kg enlevé de chacun de ces paramètres. Cet enlèvement engendre une biomasse qui elle-même engendre à son tour une augmentation de la fréquence des lavages des biofiltres dont la demande énergétique supplémentaire est évaluée selon Mohapatra (2010), à 0,1 kWh/kg enlevé de CDBO₅. Tel que le montre le Tableau 5.2, les données de performances de la cellule test durant les essais de condition d'aération montrent un enlèvement de la charge carbonée et azotée de 526 kg-O₂/d et 24.6 kg-N/d respectivement. Les données de performances de la cellule de contrôle montrent un enlèvement nettement inférieur de la charge carbonée avec 94.8 kg-O₂/d enlevé et montrent une augmentation de la charge azotée en raison des conditions d'anoxie qui prévalaient dans cette cellule. Les données de performance de la cellule test lors des essais de paramètre modifié de lavage montrent un enlèvement de la charge polluante en CDBO₅ et N-NH₄⁺ de 223 kg-O₂/d et 102 kg-N/d respectivement. La charge enlevée dans la cellule de contrôle a été évaluée à 206 kg-O₂/d et 34,6 kg-N/d pour la CDBO₅ et le N-NH₄⁺ respectivement.

Tableau 5.2 Impacts opérationnels, rendement et demande en énergie

Essais opérationnels	kg(-O ₂ , -N)/d enlevé				Δ enlèvement entre la cellule test et de contrôle (kg(-O ₂ , -N)/d)		Consommation d'énergie supplémentaire estimée ^a		
	Cellule test		Cellule contrôle				Δ CDBO ₅ ^b	Δ N-NH ₄ ⁺ ^b	lavage ^b
	CDBO ₅	N-NH ₄ ⁺	CDBO ₅	N-NH ₄ ⁺	Δ CDBO ₅	Δ N-NH ₄ ⁺	kWh/kg/d	kWh/kg/d	kWh/kg/d
Condition d'aération	526	24,6	94,8	-24,5	431	24,6 [*]	345	19,7	43,1
Paramètre modifié de lavage	223	102	206	34,6	17,0	67,2	13,6	53,8	1,7
Ajustement du débit	470	39,1	336	-8,31	134	39,1 [*]	107	31,2	13,4

^aConsommation provenant de l'augmentation d'air de procédé et du nombre de lavage anticipé en fonction de l'enlèvement de la CDBO₅.

^bÉvalué à 0,8 kWh/kg de CDBO₅ et de N-NH₄⁺ enlevé et 0,1 kWh/kg de CDBO₅ enlevé pour l'augmentation des lavages (Mahapatra, 2010).

*Le Δ d'enlèvement du N-NH₄⁺ pour les essais de condition d'aération et d'ajustement du débit tient uniquement compte des valeurs de la cellule en ignorant les valeurs négatives de charge polluante dans la cellule de contrôle.

Les données de charges enlevées pour la cellule test lors des essais d'ajustement du débit montrent un abattement de 470 kg-O₂/d pour la CDBO₅ et de 39,1 kg-N/d pour le N-NH₄⁺. Les résultats d'enlèvement pour la cellule de contrôle montrent un abattement de la charge polluante en CDBO₅ de 336 kg-O₂/d et une augmentation de la charge azotée. Ainsi, tel que présenté au Tableau 5.2, le delta d'enlèvement entre la cellule test et la cellule de contrôle a

été évalué pour chaque condition opérationnelle testée. La différence d'enlèvement de la cellule test par rapport à la cellule de contrôle au niveau de la charge en CDBO₅ et en N-NH₄⁺ obtenue lors des essais de conditions d'aération a été évaluée à 431 kg-O₂/d et 24,6 kg-N/d respectivement. Lors des essais de paramètre modifié de lavage, la différence de la charge polluante enlevée a été estimée à 17,0 kg-O₂/d et 67,2 kg-N/d en CDOB₅ et N-NH₄⁺ respectivement. Finalement, la différence observée entre la cellule test et la cellule de contrôle pour l'enlèvement de la charge polluante lors des essais d'ajustement du débit a été évaluée à 134 kg-O₂/d et 39,1 kg-N/d en CDBO₅ et N-NH₄⁺ respectivement.

Les demandes énergétiques pour un enlèvement supplémentaire de CDBO₅ et de N-NH₄⁺, et ce, en lien avec l'alimentation en air de procédé et les lavages des biofiltres, ont été estimées sur la base d'un ratio de 0.8 kWh/kg de CDBO₅ ainsi que de N-NH₄⁺ réduit et 0.1 kWh/kg-CDBO₅ réduit respectivement en accord avec les travaux de Mohapatra (2010). Les résultats présentés dans le Tableau 5.2 résumant l'estimation de la consommation énergétique sont exprimés en kWh/kg/d en accord avec l'une des stratégies proposées par Longo, d'Antoni et al. (2016). Subséquemment, l'enlèvement supplémentaire de la CDBO₅ et du N-NH₄⁺ observé durant l'essai d'aération (Tableau 5.2) a engendré : **1)** une augmentation de 431 kg-O₂/d et 24,6 kg-N/d d'enlèvement de CDBO₅ et de N-NH₄⁺ dans la cellule test par rapport la cellule de contrôle, occasionnant alors une demande énergétique supplémentaire évaluée à 345 et 19,7 kWh/kg/d respectivement due à la fourniture en air de procédé; **2)** une demande énergétique supplémentaire de 43,1 kWh/kg/d dû à l'augmentation des lavages. Ainsi, la demande énergétique totale supplémentaire dans la cellule test a été estimée à 365 kWh/kg/d pour l'enlèvement de la charge carbonée et azotée en plus de l'augmentation due aux lavages, par rapport à la cellule de contrôle.

Les données de performance de la station d'épuration lors des essais de paramètre modifié de lavage (Tableau 5.2) montrent une différence d'enlèvement de la CDBO₅ et du N-NH₄⁺ entre la cellule test et la cellule de contrôle de 17,0 kg-O₂/d et 67,2 kg-N/d respectivement. L'enlèvement supplémentaire de la CDBO₅ et du N-NH₄⁺ a conduit à : **1)** une demande énergétique supplémentaire de 13,6 kWh/kg-O₂/d et de 53,8 kWh/kg-N/d respectivement due

à la fourniture en air de procédé; **2)** une légère augmentation du nombre de lavages dans le biofiltre test par rapport à celui de contrôle estimé par l'enlèvement de la CDBO₅, occasionnant une demande énergétique supplémentaire évaluée à 1,70 kWh/kg-O₂/d. La demande énergétique totale supplémentaire s'élève ainsi à 67,4 kWh/kg/d pour l'enlèvement de la charge carbonée et azotée en plus de l'augmentation due aux lavages.

Finalement, les données de performance de la station d'épuration lors des essais sur l'ajustement du débit (Tableau 5.2) montrent un enlèvement de la CDBO₅ et du N-NH₄⁺ de 134 kg-O₂/d et 8,30 kg-N/d respectivement entre la cellule test et la cellule de contrôle. Ainsi, l'enlèvement supplémentaire de la CDBO₅ et du N-NH₄⁺ a engendré : **1)** une demande énergétique supplémentaire de 107 kWh/kg-O₂/d et 31,2 kWh/kg-N/d respectivement due à l'alimentation en air de procédé; **2)** une demande énergétique relative aux lavages de 13,4 kWh/kg-O₂/d. La demande énergétique totale supplémentaire s'élève alors à 138 kWh/kg/d pour l'enlèvement de la charge carboné et azoté en plus de l'augmentation due aux lavages.

5.5 Discussion

Les résultats des trois conditions d'essais testées ont montré une amélioration du traitement au niveau de l'enlèvement de la DCO et de la CDBO₅. Les essais d'aération et de modification des paramètres de lavage ont également mis en évidence une amélioration sur le taux d'enlèvement du N-NH₄⁺. Les résultats de NTK ont quant à eux montré une amélioration du traitement par rapport à la cellule contrôle ainsi que l'affluent des biofiltres lors des essais d'aération et de modification des paramètres de lavages. Aucune variation statistiquement significative dans les concentrations de NTK n'a été constatée pour l'autre situation observée. L'analyse des résultats a mis en évidence que l'enlèvement de la charge azotée se produit dans la partie inférieure de la cellule de traitement, zone qui s'est avérée propice au processus de nitrification du N-NH₄⁺. Les résultats démontrent aussi l'importance de la disponibilité d'oxygène dissous pour assurer le bon fonctionnement du procédé en tout temps.

5.5.1 Effets de l'aération sur le traitement général

L'importance de l'aération pour le bon fonctionnement d'un BAF n'est plus à démontrer à ce jour. Une injection trop importante d'air de procédé risque de produire une surcroissance du biofilm et des biopolymères produits par les bactéries présentes, conduisant ainsi au colmatage prématuré des filtres, alors qu'une injection insuffisante d'oxygène peut créer des zones anoxiques dans le filtre réduisant alors considérablement les performances de traitement (Gerardi, 2006; Mendoza-Espinosa & Stephenson, 1999). Par contre, le comportement du procédé soumis à une aération intense après plusieurs mois de carence afin d'en observer la résilience restait encore à être étudié. Le procédé Biocarbonate® peut enlever 85 % de la CDBO₅ (Stephenson, Cornel, & Rogalla, 2004) et les données antérieures de la station sont en accord avec cette donnée puisqu'un taux d'enlèvement de 86 % a été observé (données non présentées). Dans la présente situation, le procédé n'a pas été conçu pour l'enlèvement de la charge en N-NH₄⁺ par nitrification. Ainsi, comme présentées à la Figure 5.3-A, les performances de traitement dans la cellule test sont nettement supérieures par rapport à la cellule de contrôle. Les charges en DCO et CDBO₅ chutent considérablement dans la partie inférieure de la cellule de traitement (4' et 5') atteignant un rendement de plus

de 90 % pour l'enlèvement de la CDBO₅. L'augmentation observée de la charge en DCO et CDBO₅ dans la cellule de contrôle par rapport à l'affluent des biofiltres, peut s'expliquer par la production nettement marquée de sulfures dans cette cellule (Figure 5.3-D). En condition d'anoxie, la cellule de contrôle produit des sulfures en partie profonde du filtre qui se dissolvent rapidement sous forme de H₂S. Ce H₂S gazeux peut alors être oxydé en partie supérieure du filtre par les *Beggiatoa*, une bactérie filamenteuse qui croît à la surface des biofilms (Nelson, Jørgensen, & Revsbech, 1986).

La faible concentration en matière organique observée dans la partie profonde de la cellule de traitement s'avérerait favorable au processus de nitrification, comme l'ont démontré les travaux de Zhu and Chen (2001). Par contre, étant donné la faible croissance des bactéries nitrifiantes (Daims & Wagner, 2010) et le fait que le procédé à l'étude n'a pas été prévu pour traiter la charge en N-NH₄⁺, peu d'enlèvements d'azote N-NH₄⁺ étaient attendus puisque la flore bactérienne nitrifiante était théoriquement absente ou inhibée. Or, un abattement de 37 % a été observé dans la cellule test durant l'essai, ce qui s'avère un résultat surprenant. Cela démontre la résilience des procédés à biomasse fixée, car malgré les conditions peu favorables qui prévalaient pour la biomasse nitrifiante, l'observation du phénomène de nitrification démontre que les bactéries responsables de ce processus (Ammonia Oxydizing Bacteria, AOB; Nitrite Oxydizing Bacteria, NOB) étaient bien présentes. Cela a d'ailleurs été confirmé par Bourgeois, Monette et al. (2018) qui avaient mis en évidence par analyse qPCR, la présence de colonies de AOB et de NOB dans le biofiltre, particulièrement dans la partie profonde de celui-ci. L'augmentation observée de la charge en N-NH₄⁺ dans la cellule de contrôle par rapport à l'affluent des biofiltres peut s'expliquer par le fait que les *Nitrospira*, principales bactéries membres des NOB, ont la capacité de réduire en conditions d'anoxie l'azote organique et les NO₃⁻ présents en N-NH₄⁺ (Lucker et al., 2010). Au niveau de l'oxygène dissous, la valeur observée de 2.5 mg-O₂/L dans la partie supérieure (1' de profondeur) de la cellule test (Figure 5.3-B) serait suffisante pour assurer le bon fonctionnement des procédés à culture en suspension où il est recommandé d'avoir une concentration de 2 à 3 mg-O₂/L (Metcalf & Eddy, 2014). Toutefois, selon les observations de Li et Bishop (2004), concernant les taux de transfert d'oxygène dissous dans le milieu liquide

ainsi que dans le biofilm, ces concentrations d'oxygène suggéré de 2 à 3 mg-O₂/L seraient en fait limitantes pour les cultures fixées en créant des zones anoxiques dans les parties profondes du biofilm. Ces conditions de déficit en oxygène ont été spécifiquement observées dans la cellule de contrôle où les valeurs d'oxygène dissous sont demeurées sous 1 mg-O₂/L pour toutes les profondeurs; aucune réduction significative de la CDBO₅ ou de la charge en N-NH₄⁺ n'y a d'ailleurs été relevée. Les valeurs maximales d'oxygène dissous dans la cellule test ont été observées dans la partie inférieure, soit respectivement 6,1 et 4,4 mg-O₂/L à 4' et 5' de profondeur, zone où un enlèvement statistiquement significatif ($p < 0,05$) de la charge organique (DCO, CDBO₅) ou une nitrification significative ont été enregistrés. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Boller et al. (1994) qui suggèrent que la concentration d'oxygène dissous dans la phase liquide pour une culture fixée devrait généralement être maintenue à plus de 4 mg-O₂/L. Certains auteurs ont même observé des concentrations allant à 6 mg-O₂/L pour assurer une nitrification complète dans une culture fixée (Holloway et al., 2008; Zhao et al., 2006).

5.5.2 Effets des modifications des paramètres de lavage sur le traitement en général

Les résultats des essais n'ont pas démontré de différences statistiquement significatives entre la cellule test et celle de contrôle au niveau de l'enlèvement de la charge carbonée. Toutefois, ils ont révélé une différence significative à 4' de profondeur pour l'enlèvement du N-NH₄⁺ (Figure 5.4-B). La modification des paramètres de lavages vers des cycles moins intenses et plus courts favorise donc l'activité de la biomasse nitrifiante dans la partie inférieure du filtre, atteignant un abattement global de N-NH₄⁺ dans la cellule de près de 40 %. Ce résultat corrobore les observations de Lee et al. (2006) concernant le temps de rétention des solides (SRT) contrôlé par les lavages à contre-courant, favorisant alors le développement des bactéries nitrifiantes dans la partie profonde du lit filtrant, ainsi que les observations de Bourgeois, Monette et al. (2018) sur le développement de ces bactéries en partie profonde. De plus, les résultats d'oxygène dissous dans la cellule test et celle de contrôle montrent un schéma évolutif semblable avec une valeur maximale moyenne de près de 6 mg-O₂/L atteinte à 4' de profondeur. L'oxygène dissous n'étant donc pas un facteur

limitant pour la nitrification, l'activité nitrifiante observée à 4' de profondeur dans la cellule test doit provenir du fait que des lavages fréquents et moins intenses maintiennent une faible épaisseur du biofilm, favorisant ainsi les conditions de diffusion des composés solubles et de l'oxygène dissous présent (Boller et al., 1994). Comme le montre la Figure 5.4-A, cette profondeur constitue également la zone d'enlèvement maximal de la DCO et de la CDBO₅.

5.5.3 Effets de l'ajustement du débit sur le traitement en général

Les résultats d'enlèvement de la DCO, de la CDBO₅ ainsi que du N-NH₄⁺ dans la cellule test n'ont pas montré d'améliorations statistiquement significatives par rapport à la cellule de contrôle. Ces résultats laissent croire que l'augmentation du temps de filtration à 21 min (cellule test) par rapport à 15.4 min (cellule de contrôle) ne procure pas davantage au niveau du traitement dans ce cas bien précis. Nogueira, Melo et al. (2002) ont fait des observations similaires sur l'abattement de la charge carbonée et le processus de nitrification; il ont tiré comme conclusion que l'augmentation du temps de rétention hydraulique pourrait être insuffisant pour améliorer l'efficacité du traitement. Toutefois, les résultats montrent que la concentration d'oxygène dissous dans la cellule test demeure significativement plus élevée que la cellule de contrôle. L'augmentation du temps de rétention hydraulique dans le biofiltre favorise ainsi un accroissement de la concentration d'oxygène dissous dans le liquide interstitiel. Selon Meng, Shi et al. (2007), la concentration d'oxygène dissous diminue en même temps que le temps de rétention hydraulique, corroborant ainsi les actuelles observations sur le lien entre ces deux paramètres. Les performances réduites d'enlèvement du N-NH₄⁺ dans la cellule test par rapport aux essais précédents pourraient s'expliquer par les valeurs observées plus faibles que les 6 mg-O₂/L d'oxygène dissous à 4' de profondeur (Holloway et al., 2008; Zhao et al., 2006). Sans avoir d'effets marqués pour l'enlèvement de la charge carbonée, il apparaît toutefois que l'augmentation du temps de rétention hydraulique peut être un paramètre contrôlant la disponibilité de l'oxygène dissous dans le biofiltre sous condition d'une charge massique constante.

Les résultats d'enlèvement de la charge en CDOB₅ et N-NH₄⁺ en kg/d présentés au Tableau 5.2 permettent une estimation de la consommation d'énergie supplémentaire en lien avec les performances de traitement entre la cellule test et de contrôle. Lors des essais sur les conditions d'aération, l'enlèvement de la CDOB₅ est principalement responsable de la consommation d'énergie supplémentaire, estimée à 345 kWh/kg/d par rapport à la demande totale estimée à 365 kWh/kg/d. Lors des essais de paramètre modifié de lavage, c'est l'enlèvement de la charge en N-NH₄⁺ qui est principalement responsable de la consommation d'énergie supplémentaire, estimé à 53,8 kWh/kg/d par rapport à la demande totale estimée à 67,4 kWh/kg/d. Finalement, lors des essais d'ajustement du débit, l'enlèvement de la charge en CDOB₅ est principalement responsable de la consommation d'énergie supplémentaire, estimée à 107 kWh/kg/d par rapport à la hausse de la demande totale évaluée à 138 kWh/kg/d.

5.6 Conclusion

Les résultats de cette étude ayant pour but d'améliorer le traitement d'un BAF de type Biocarbone® ont démontré une meilleure capacité de traitement en ce qui concerne l'enlèvement de la DCO et de la CDOB₅ dans la cellule test lors des essais sur l'aération (ajout de 3000 m³/h d'air de procédé pour un enlèvement de DCO et CDOB₅ de 54,7 et 80,6 % respectivement) et des modifications des paramètres de lavages (lavages plus courts et plus fréquents pour un enlèvement de DCO et CDOB₅ de 49,4 et 83,5 %). De plus, la nitrification du N-NH₄⁺ a également été observée lors de ces essais alors que le système de biofiltration en place n'est pas prévu à cet effet. L'élément clé favorisant la nitrification semble être la concentration en oxygène dissous dans la partie profonde de la cellule. En effet, c'est dans cette zone de la cellule où la nitrification a pu se produire et qu'elle présentait la concentration d'oxygène dissous la plus élevée ainsi que la charge carbonée la plus faible. Les résultats montrent que l'oxygène dissous devrait être au moins à 6 mg/L pour assurer un enlèvement significatif de la charge en N-NH₄⁺. L'essai sur l'ajustement du débit (réduction du temps de rétention hydraulique) n'a pas contribué de façon significative à l'obtention de meilleurs rendements d'enlèvement de la charge carbonée ainsi que du N-NH₄⁺ entre la

cellule test et de contrôle. Toutefois, les résultats ont démontré une augmentation significative quant à la concentration de l'oxygène dissous dans la cellule test mais en dessous des 6 mg-O₂/L. Ainsi, il apparaît que l'augmentation du temps de contact avec le biofilm assurerait un meilleur transfert d'oxygène dans le liquide interstitiel, favorisant le maintien d'une forte concentration d'oxygène dissous dans la partie profonde du biofiltre. Pour en bénéficier, il faudrait davantage diminuer le temps de rétention hydraulique (en ajustant le débit) afin que l'oxygène dissous augmente aussi davantage pour d'atteindre le seuil de concentration d'oxygène dissous suffisant (6 mg-O₂/L) pour favoriser le processus de nitrification. Finalement, l'estimation de l'apport supplémentaire en énergie en fonction de l'enlèvement de la CDBO₅, du N-NH₄⁺ nitrifié et de l'augmentation des lavages de la cellule test par rapport à la cellule de contrôle, ce situerait entre 67 et 365 kWh/kg/d. Ainsi, afin de favoriser le phénomène de nitrification dans un système BAF à flux descendant (non conçu à cet effet), une aération soutenue dans la partie inférieure du filtre ainsi que des lavages plus courts et plus fréquents sont recommandés. De plus, l'ajustement du débit diminuant ainsi la charge superficielle, permet une flexibilité quant au contrôle de la disponibilité d'oxygène dissous pour le biofilm, influençant alors directement l'efficacité d'enlèvement de la matière organique et, si la teneur en oxygène atteinte est suffisamment élevée (6 mg-O₂/L), le processus de nitrification.

CHAPITRE 6

DISCUSSION

Ce chapitre présente une discussion sur les résultats obtenus des différents articles en les mettant en perspective par rapport aux études antérieures, en démontrant l'influence des modifications opérationnelles et des choix méthodologiques ainsi que les limites de l'étude. La portée de l'étude ainsi que les perspectives de recherche suite à cette thèse sont ensuite présentées.

6.1 Synthèse des articles et recommandations opérationnelles

Chaque article a fait l'objet d'une synthèse débouchant sur une conclusion succincte afin de démontrer la pertinence de l'approche méthodologique permettant de répondre aux hypothèses de recherche en lien avec les objectifs spécifiques de cette thèse. Une analyse élargie des principaux résultats est également comparée avec les études antérieures. Finalement, des recommandations opérationnelles pour les bioprocédés de type biomasse fixée issues des principales observations tirées des trois articles sont présentées et font l'objet d'une discussion.

6.1.1 Synthèse de l'article 1 : Évaluation de la biomasse nitrifiante lors de changement opérationnel avec l'approche par amorces dégénérées

La quantification des microorganismes représente toujours un défi puisqu'il s'agit d'opter pour une méthode fiable et efficace tout en limitant les contraintes relatives à son exécution. Dans la majorité des cas, la quantification de bactéries dans des milieux environnementaux réside en une estimation. En effet, puisque ces organismes sont microscopiques et qu'un biofilm bactérien est constitué d'une structure complexe hétérogène, les techniques de quantification doivent composer avec les nombreuses interférences pouvant altérer le résultat. Plusieurs techniques ont été mises au point depuis la simple analyse estimant la population par la quantité de matières volatiles en suspension jusqu'aux techniques à la fine

pointe de la technologie employant des marqueurs moléculaires spécifiques. Toutefois, l'utilisation de marqueurs génétiques est limitée par le choix du marqueur en question.

Tel que présenté dans l'article 1, les séquences génétiques d'ARNr-16S, bien que communes à toutes les bactéries, ne sont pas assez spécifiques pour s'assurer que l'analyse qui en découle corresponde exclusivement au groupe bactérien à l'origine de l'étude. C'est ainsi que des marqueurs moléculaires plus spécifiques aux organismes d'intérêt ont été développés pour cibler des caractéristiques métaboliques exclusives. Dans le cas des bactéries nitrifiantes, le gène *amoA*, spécifique à tous les microorganismes de type AOA et AOB, s'avère être un meilleur choix pour la caractérisation de cette population que le gène ARNr-16S en engendrant moins de faux positifs. Dans le cas des NOB, le choix s'est porté sur le gène *nxrB* pour les mêmes raisons. Toutefois, cette approche sensible est délicate. Afin d'obtenir une quantification précise des organismes ciblés, les amorces génétiques pour les gènes *amoA* et *nxrB* développés par les études antérieures ont été faites sur une sélection d'organismes restreints afin de respecter les limites de la méthode. Les études entre autres menées par Dionisi et al. (2002), Harms et al. (2003), Pester et al. (2014) et Grubber-Dorninger et al. (2015) en témoignent. Ainsi, les résultats de quantification produits par qPCR, bien que rigoureux dans la méthode, s'avèrent être ciblés strictement sur la séquence génétique d'un nombre restreint d'espèces d'AOB ou de NOB présents dans les bioprocédés. Cela permet alors d'éviter les mauvais appariements d'oligonucléotides parmi les nombreuses espèces différentes de bactéries présentes dans un biofilm. Cela présente par contre le désavantage fort probable de sous-évaluer la quantité totale de bactéries du groupe AOB ou NOB présent.

Ce constat se rencontre moins lors d'étude par PCR classique, car les séquences génomiques amplifiées sont de l'ordre de plusieurs centaines de paires de bases. C'est toutefois l'analyse *post*-PCR qui présente quelques lacunes malgré des tentatives des travaux de Dionisi et al. (Dionisi et al., 2002a; Dionisi et al., 2002b) d'améliorer la technique et l'exactitude des résultats par analyse PCR compétitive. Lors d'analyse par qPCR ou PCR quantitative en temps réel, les séquences génomiques amplifiées sont courtes, avec une longueur variant

entre 100 et 200 paires de bases maximum. Cela s'avère nécessaire pour assurer la rapidité du test. Or, avec des séquences si courtes, le risque d'amplifier de mauvais tronçons de génomes augmente. Cela nécessite alors de centrer la conception des amorces sur une séquence génétique d'une espèce bien précise et de traiter *a posteriori* les séquences amplifiées afin de confirmer qu'elles sont bien représentatives de ce qui était prévu initialement. Tout ce processus analytique implique des coûts non négligeables pour les exploitants de station d'épuration qui désirerait obtenir cette information pour des raisons opérationnelles. Cette analyse pourrait difficilement être réalisée sur une base routinière.

Les travaux faisant l'objet de l'article 1 reposent sur le principe d'une analyse quantitative avec l'approche par amorces dégénérées afin de contourner ces contraintes et d'obtenir un résultat de population relative plus représentative de la condition réelle de l'échantillon. L'approche par amorces dégénérées se fonde sur l'utilisation d'amorces ayant des disparités sur certaines paires de bases créant ainsi un appariement potentiellement moins stable, mais regroupant un maximum d'espèces qui possède le gène ciblé, mais qui, au fil de l'évolution, subit quelques modifications génétiques. Ce type d'amorces est généralement évité, car elles ne permettent pas de confirmer avec certitude quelles espèces ont fait l'objet d'une amplification. Par contre, dans un contexte où ce n'est pas l'espèce spécifique qui présente l'intérêt premier, mais bien la famille auquel cette espèce appartient, l'utilisation des amorces dégénérées présente un avantage certain. Ainsi, en comparant les séquences génétiques des gènes *amoA* et *nxB* des principales espèces d'AOB et de NOB qui ont été observées dans les bioprocédés (ANNEXE II), des amorces dégénérées pour l'amplification qPCR ont été développées de telle sorte à englober la majorité des disparités génétiques afin d'augmenter la possibilité d'aller chercher, en une seule analyse, le maximum d'espèces différentes de la famille d'intérêt. Ces amorces d'oligonucléotides ont d'abord été testées sur des échantillons de biofilms positifs (provenant d'un pilote de nitrification) et négatifs avant d'être utilisées dans les échantillons provenant du média filtrant de la station d'Auteuil. Le même exercice a également été fait pour des amorces développées sur la base d'une séquence génomique partielle du gène ARNr-16S (ANNEXE II). Ces amorces ont pour objectif d'évaluer la population relative de toutes les bactéries présentes dans le biofilm. Plusieurs amorces

ARNr-16S ayant déjà été développées dans des études antérieures ont été utilisées, mais aucune d'entre elles n'était développée sur la base de l'approche par amorces dégénérées. C'est alors pourquoi les présents travaux ont développé une toute nouvelle paire d'amorces ciblant le gène ARNr-16S afin de conserver la même logique et la même approche tout au long de l'étude. Les séquences complètes des amorces développées et utilisées pour l'article 1 sont présentées au Tableau 3.1.

En ce qui concerne l'analyse qPCR avec les amorces ARNr-16S pour caractériser les bactéries totales, les résultats ont démontré que les changements opérationnels n'avaient pratiquement pas d'effet significatif (ANNEXE I). Les valeurs obtenues de présence relative des bactéries totales, autant dans la partie supérieure du biofiltre que dans sa section inférieure, se situent en moyenne autour de 15 à 20 % de tout le biofilm, et ce, tout au long des différents essais. Cela tend à démontrer que les changements opérationnels effectués (aération, modification des séquences de lavages et ajustement du débit) n'ont pas eu d'impact significatif sur la population totale bactérienne, mais il n'en demeure pas moins que cette population bactérienne peut subir des changements au sein même du biofilm.

Par ailleurs, l'utilisation des marqueurs génétiques *amoA* et *nxrB* a permis d'évaluer la présence relative des AOB et NOB au sein du biofilm fixé sur le grain de schiste. Ces évaluations relatives permettent une estimation de la présence (occupation) de ces bactéries au sein du biofilm, par rapport à l'ensemble de la population bactérienne, toutes espèces confondues. Cela permet de constater que, malgré le fait que les essais n'ont pas révélé de différences significatives quant à la présence relative des bactéries au sein de tout le matériel génétique, les AOB et NOB ont, quant à eux, évolué positivement. Les analyses ont révélé des résultats surprenants puisqu'elles ont permis de montrer la présence de bactéries nitrifiantes au tout début des essais à toutes les profondeurs du biofiltre alors que ceux-ci étaient maintenus en un état non propice à ce type de bactéries pendant des années. Les essais d'aération et de modification des paramètres de lavages ont permis de maintenir la présence relative des AOB au-delà des NOB avec des valeurs moyennes se situant entre 0,075 et 6 %. Cela représente près du double de ce qui a été relevé par les études de Dionisi et al. (2002).

Par contre, les valeurs de NOB observées lors de ces deux essais se sont avérées nettement inférieures à celles relevées par ces chercheurs avec en moyenne 0,005 à 0,05 % de présence relative comparativement à 0,39 %. Les essais sur le contrôle du débit sont ceux ayant permis l'obtention de valeurs de NOB les plus élevées, atteignant jusqu'à 6 % de présence relative par rapport à l'ensemble des bactéries. Ce résultat est également supérieur à ce qui a été relevé dans la littérature. Il est possible que, lorsque les conditions favorables sont atteintes pour le développement des NOB, ceux-ci s'imposent davantage au sein du biofilm. Il est connu que les *Nitrospira* possèdent une polyvalence métabolique que l'on soupçonne être un avantage pour la compétition entre espèces lors du développement du biofilm (Koch et al., 2015). Les résultats obtenus lors des essais sur le débit s'accordent pour appuyer cette hypothèse. Le fait que les valeurs observées sont plus élevées que ce qui a été relevé dans la littérature ne présente rien de surprenant étant donné l'utilisation d'amorces dégénérées. Celles-ci ont pour objectif d'aller chercher un spectre étendu d'espèces d'AOB et de NOB afin d'estimer le plus précisément possible l'ensemble de ces communautés spécifiques.

Les analyses FISH ont été employées comme complément de la méthode afin d'appuyer les informations obtenues par qPCR avec une autre technique utilisant aussi des marqueurs génétiques. Elles ne constituent pas une méthode quantitative des espèces ainsi marquées par le marqueur génétique; elles permettent simplement, par intensité lumineuse (Li et al., 2004), de confirmer si les espèces sont présentes dans le biofilm, de les situer physiquement dans le biofilm et, par le ratio intensité/volume, d'extrapoler sur leur prédominance. Des essais d'hybridation sur témoins négatifs (cultures de bactéries de type coliformes fécaux) ont démontré que les marqueurs génétiques utilisés ne conduisent pas à de faux appariements sur des cultures bactériennes hétérotrophes, principales bactéries constituant le biofilm à l'étude. Des témoins positifs (pilote nitrifiant) ont également été faits afin de démontrer leur appariement sur un biofilm nitrifiant, tel qu'escompté sur les échantillons de biofilms fixés sur les grains schiste. Contrairement à l'utilisation du FISH d'autres études, les marqueurs moléculaires utilisés dans le cadre des présents travaux n'ont pas permis d'identifier avec précision les espèces bactériennes ainsi marquées. Les marqueurs génétiques ont été conçus dans une optique de sélection d'un maximum d'espèces bactériennes nitrifiantes (AOB et

NOB) en même temps et en une seule étape. Ainsi, en plus du marquage des polysaccharides avec le WGA tel que présenté en Figure 6.1, l'image obtenue présente l'ensemble du biofilm (WGA) et les regroupements en colonies d'AOB (atto 647) et de NOB (atto 488). La Figure 6.1 représente un échantillon provenant de la cellule test (biofiltre 1, cellule 3) lors des essais sur les paramètres de lavage. Sur cette figure, les agrégats de NOB sont bien visibles (points verts d'une intensité plus soutenue) surtout à partir de 4' et 5' de profondeur. Les agrégats d'AOB, représentés par des points lumineux blancs, sont particulièrement visibles à 2' et 4' de profondeur. Les zones vertes et blanches qui n'apparaissent pas comme étant des points sont en fait le bruit de fond issu de l'expérience elle-même. Lors de la mesure d'intensité par rapport au volume, ces bruits de fond ne sont pas pris en considération. Ainsi, par comparaison avec les essais d'échantillons de contrôle et les témoins négatifs, les résultats démontrent un accroissement des agrégats qui correspondent aux développements des bactéries nitrifiantes lors des différents essais. Les Figures 6.2, 6.3 et 6.4 présentent les résultats des tests de contrôle sur les sondes utilisées lors des essais FISH. Les essais négatifs avec la sonde atto488 (NOB) ont été effectués sur un biofilm hétérotrophe et aucune émission n'a été détectée (non présenté). La Figure 6.2 représente l'essai positif avec la sonde atto488 effectué sur un biofilm issu d'un pilote de nitrification. Ce biofilm est donc constitué de bactéries autotrophes de type AOB et NOB. La Figure 6.3 représente l'essai négatif avec les sondes atto647 (AOB) sur le même échantillon hétérotrophe. Un voile subtil représentant le bruit de fond émis lors de l'utilisation de cette amorce spécifique est visible. La figure 6.4, quant à elle, constitue un test positif avec les sondes atto647 (AOB) sur le biofilm autotrophe. Les agrégats lumineux correspondants aux colonies d'AOB qui ont proliféré au sein de ce biofilm y apparaissent clairement.

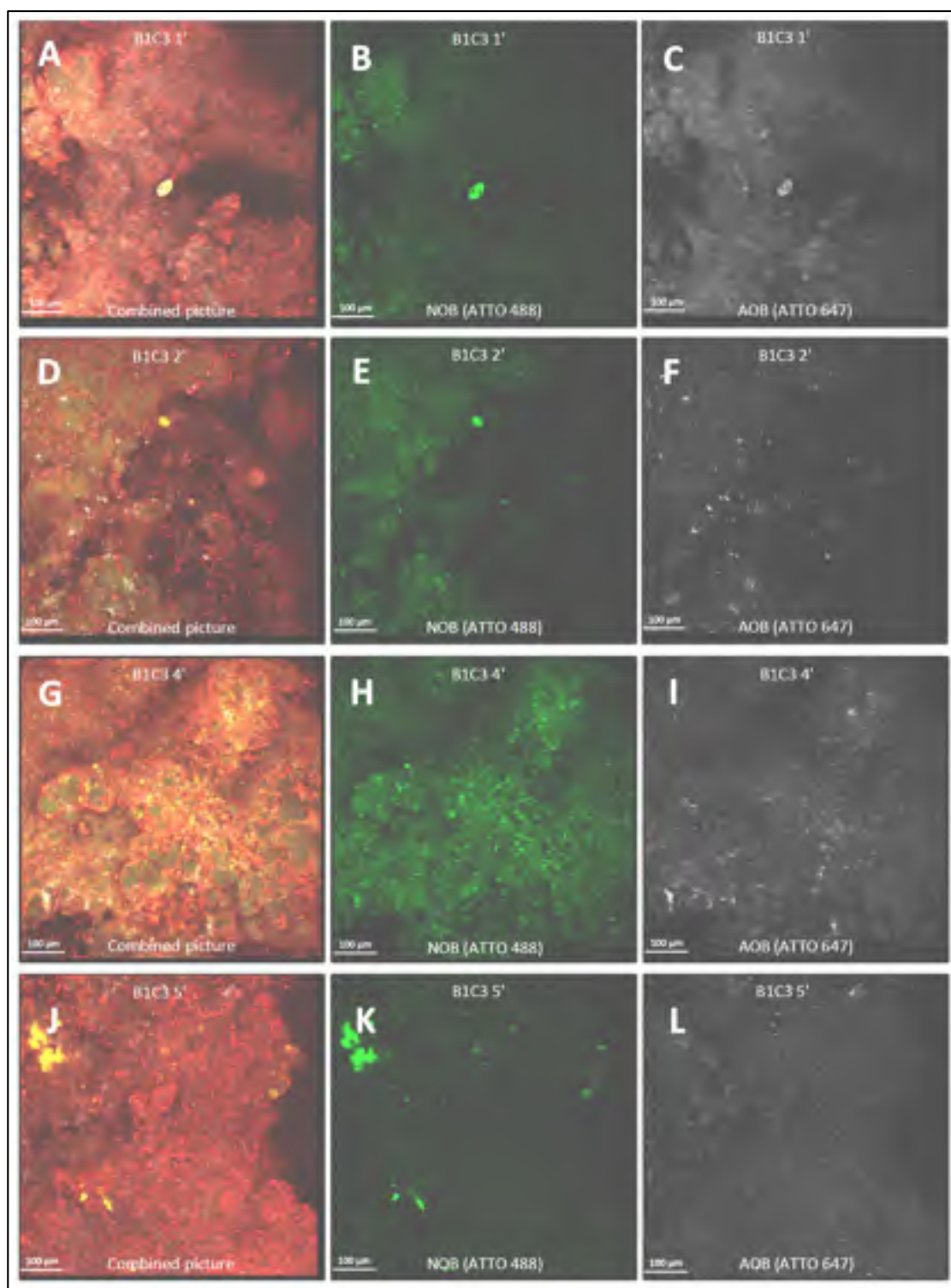


Figure 6.1 Analyse FISH d'un biofilm avec fluorochromes atto 647 (AOB), atto 488 (NOB) et marquage WGA (exopolymères)

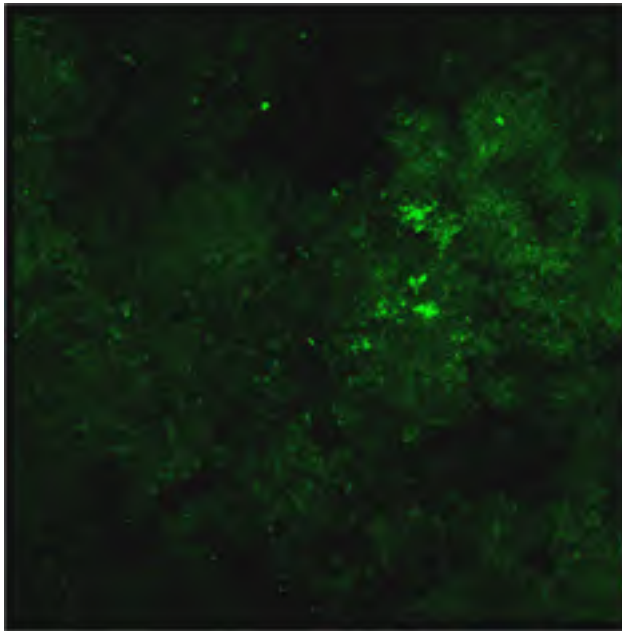


Figure 6.2 Test positif sur biofilm autotrophe (pilote nitrifiant) avec la sonde atto488 (NOB)

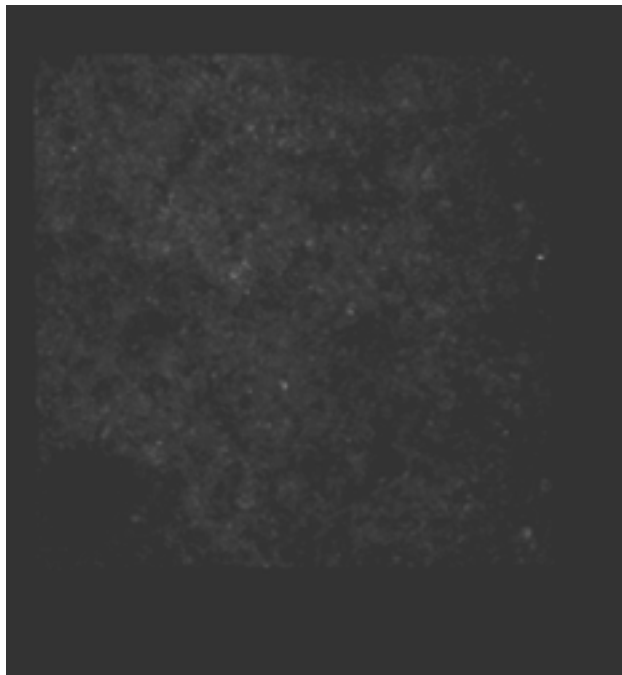


Figure 6.3 Test négatif avec la sonde atto647 (AOB) sur biofilm hétérotrophe

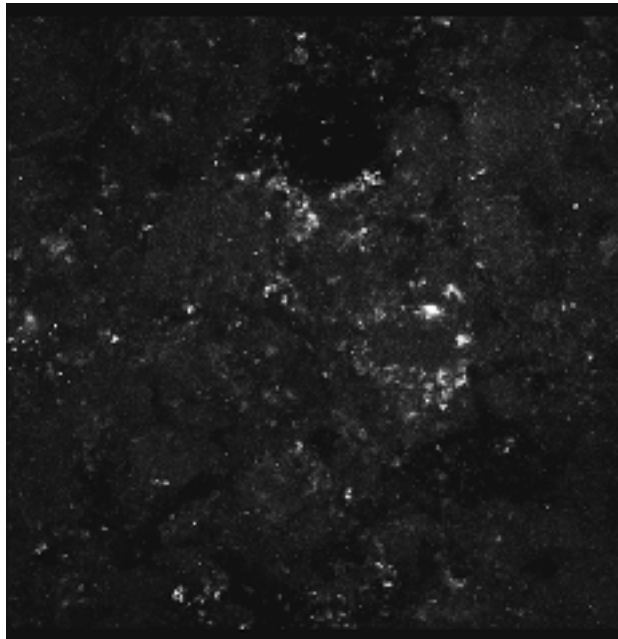


Figure 6.4 Test positif avec la sonde atto647 (AOB) sur biofilm autotrophe (pilote nitrifiant)

Les essais de biologie moléculaire employés (FISH + microscopie confocale) sont particulièrement coûteux puisque les amorces d'oligonucléotides ainsi que le matériel pour l'analyse (produits chimiques, microscope confocale, etc.) sont dispendieux et doivent être manipulés par des personnes qualifiées. Ainsi, il apparaît exclu d'en faire une analyse de routine en milieux municipaux. Par contre, dans le cadre de la présente étude, ces analyses ont apporté des réponses aux questions relatives quant à l'emplacement préconisé par les nitrifiantes au sein du biofilm. En effet, les résultats démontrent que les bactéries nitrifiantes, lorsqu'elles sont moins en compétition avec les hétérotrophes, peuvent ainsi se développer en surface du biofilm. Ce résultat s'explique par la meilleure diffusion de l'oxygène dissous disponible vers le biofilm. Ce questionnement était d'intérêt dans le cas présent puisqu'en cherchant à définir les effets des modifications opérationnelles ayant un impact sur le développement des nitrifiantes, il fallait également s'assurer que les bactéries ainsi favorisées prennent pleinement avantage des forces de cisaillement (modification des paramètres de lavages) et des nutriments disponibles (augmentation du temps de rétention hydraulique), et ce, afin de confirmer les hypothèses de base ayant conduit à ces approches opérationnelles en particulier.

Les résultats présentés dans l'article 1 ont montré l'effet positif des changements opérationnels sur le développement des bactéries nitrifiantes dans un lit filtrant biologique aéré. L'aération permet une certaine réactivation des bactéries autotrophes dormantes dans le biofilm testé puisque celles-ci ont été retrouvées également dans la cellule de contrôle malgré les conditions non favorables à leur présence. Cela corrobore le fait que ces bactéries sont résistantes et résilientes. Les modifications des paramètres de lavages afin de les rendre plus courts, moins intense, mais plus fréquent, ont également eu un effet positif sur le développement des bactéries nitrifiantes en augmentant leur présence relative particulièrement dans la partie profonde de la cellule, les AOB étant à ce moment toujours prédominants par rapport aux NOB. Finalement, la réduction du temps de rétention hydraulique, en imposant une restriction sur l'entrée d'eaux usées dans la cellule de traitement, a eu un impact positif sur le développement des bactéries nitrifiantes en augmentant de façon générale l'ensemble de ces bactéries à toutes les profondeurs. Fait à noter, les NOB se sont avérées largement dominantes par rapport aux AOB allant ainsi en accord avec les études précédentes sur les populations nitrifiantes dans les eaux usées. En conclusion, la première hypothèse de recherche, en lien avec l'objectif 1, est confirmée puisque les résultats démontrent une amélioration au niveau du développement des AOB et des NOB suite aux modifications opérationnelles. Également, il s'est avéré possible d'augmenter la présence relative de ces bactéries au sein d'un système de traitement qui n'était pas en mesure d'assurer la nitrification.

6.1.2 Synthèse de l'article 2 : Population relative d'AOB et NOB et performance de traitement

Les travaux réalisés ont permis d'établir l'approche qPCR par amorces dégénérées. Les résultats obtenus ont démontré que cette technique permettait de suivre efficacement le développement des bactéries nitrifiantes dans un biofilm hétérogène. La présence relative des bactéries nitrifiantes par rapport à l'ensemble de tout le biofilm ainsi que les performances de traitements du procédé restent encore à être corrélée. Ainsi, en présence d'un procédé par biofiltration exempt de nitrification, les hypothèses clés ont été les suivants : les changements opérationnels favorisant le développement de la biomasse nitrifiante vont, dans une certaine

mesure, engendrer une nitrification observable dans les eaux traitées, tandis que les performances de traitements en biofiltration ne sont pas nécessairement proportionnelles à la quantité de microorganismes détectés dans le biofilm.

Les résultats de quantifications relatives par qPCR et amorces dégénérées suite aux modifications opérationnelles (aération, modification des paramètres de lavages et réduction du débit) ont démontré une augmentation de la population nitrifiante surtout dans la partie profonde du média filtrant (4' et 5'). Cette augmentation s'est avérée particulièrement notable auprès de la population des NOB avec des valeurs observées d'abondance relative de moins de 0.005 % lors des essais sur l'aération et la modification des paramètres de lavages, jusqu'au-delà de 0,15 % lors des essais sur la restriction du débit. Il apparaît donc que les modifications opérationnelles ont un impact positif sur le développement des nitrifiantes et que cela est particulièrement bénéfique pour les NOB qui dominent largement sur les AOB lors des essais sur la restriction de débit. En effet, l'abondance relative des AOB a également augmenté tout au long des essais, avec des valeurs observées passant d'environ 0,01 % jusqu'à près de 0,05 %. Ces résultats sont en accord avec la tendance observée dans la littérature des cultures en suspension nitrifiantes (Daims et al., 2000; Dionisi et al., 2002; Graham et al., 2007; Harms et al., 2003; Winkler et al., 2012). En effet, les observations de Dionisi et al. (2002) rapportent des valeurs d'abondances relatives obtenues par PCR compétitive, de 0,0033 % pour les AOB et de 0,39 % pour les NOB par rapport à la population bactérienne globale. C'est entre autres pourquoi les valeurs des NOB sont supérieures à celles présentées dans l'article 2, puisque celles-ci sont rapportées sur l'ensemble de tout le matériel génétique du biofilm. De plus, les analyses de Dionisi et al. (2002) ont été effectuées dans des stations d'épuration à vocation de nitrification. Cependant, les résultats des AOB observés sont supérieurs dans les présents travaux, ce qui laisserait sous-entendre à une sous-évaluation possible par l'approche conventionnelle et que la méthode d'analyse par qPCR avec amorces dégénérées permet une estimation plus large des différentes espèces possédant le gène *amoA*. Les résultats obtenus par Harms et al. (2003) ont été effectués par analyse et décompte direct du nombre de cellules dans un biofilm nitrifiant. Ces chercheurs sont arrivés à déterminer, dans une station municipale des eaux

usées de type boues activées, que les NOB avec 8,6 % sont supérieures aux AOB avec 2,9 %, par rapport à l'ensemble des bactéries. Concernant les NOB, Graham et al. (2007) ont rapporté lors de leurs analyses en chemostat que la population de NOB était celle qui fluctuait le plus et avec le plus d'amplitude (jusqu'à sept ordres de magnitude) lors des différents changements de paramètres testés. Ils avancent ainsi, à la lumière de leurs résultats, que la relation entre les AOB et les NOB est fragile et aurait un lien direct sur l'efficacité de la nitrification. Les résultats présentés à l'article 2 tendent en effet à démontrer que la relation entre les AOB et NOB a un effet sur l'efficacité de la nitrification. Les meilleurs rendements d'enlèvement d'azote ammoniacal sont survenus lors des essais de modification des paramètres de lavages alors que les NOB étaient restées encore relativement faibles en proportion comparée aux AOB (Figure 4.4). Le taux de nitrification observé atteignait alors de 49 %. Il apparaît évident, lorsque les NOB ont largement dominé les AOB dans le biofilm nitrifiant, que cela a perturbé la nitrification telle que rapportée par les observations de Graham et al. (2007). La présence des NOB a alors été évaluée près de 0,150 % et celle des AOB à environ 0,05 %, tandis que les performances de traitement pour l'enlèvement de l'azote ont été évaluées à 21 %. Ces résultats suggèrent que les NOB ne sont pas entièrement dépendantes de l'activité des AOB et qu'ils peuvent ainsi suivre différentes alternatives métaboliques. Cela leur conférerait un avantage indéniable dans la relation de compétition qui subsiste parmi les bactéries au sein d'un biofilm. Ainsi, le procédé de nitrification serait davantage dépendant de l'activité des AOB plutôt que des NOB (Chandran & Smets, 2000).

En résumé, les approches opérationnelles testées ont en effet eu comme conséquence de favoriser le développement des bactéries nitrifiantes tout au long du média filtrant. Les essais d'aération ont démontré que le processus de nitrification pouvait reprendre rapidement dans le procédé malgré les conditions d'anoxie existantes (non favorables pour les bactéries nitrifiantes) durant les années précédant ces essais. Les essais de modifications du lavage ont démontré l'importance de cette opération sur le maintien et le développement des groupes de bactéries d'intérêts. En effet, tel que démontré par les travaux de Feng et al. (2017), les lavages à contre-courant ont comme effet de restreindre les populations bactériennes dans la partie profonde du biofiltre. Ainsi, comme démontré par les résultats de la présente étude, la

modification des paramètres de lavages vers des cycles plus courts, moins intenses, mais plus fréquents, a eu comme effet de favoriser la biomasse nitrifiante puisque la compétition entre les autres espèces, principalement dominantes dans la partie supérieure, est amoindrie par l'action des lavages. L'augmentation du temps de contact dans le biofiltre par la réduction du débit entrant d'environ 36 % a eu un effet marqué sur le développement des NOB, mais peu d'effet sur les AOB dans la cellule test. Cependant, cette augmentation des NOB ne s'accompagne pas d'une amélioration directe de la nitrification, ce qui suggère que les NOB ne dépendent pas exclusivement de la nitrification pour leur développement. À ce sujet, Koch et al. (2015) et Daims et al. (2015) ont démontré que certaines souches de *Nitrospira* (*moscoviensis* et *inopina*) peuvent métaboliser l'urée en ammonium lorsque les nitrites ne suffisent plus et peuvent également accomplir la nitrification complète en présence d'oxygène. Cela pourrait alors fausser le bilan de nitrification dans le cas où la présence dominante des *Nitrospira* pourrait engendrer une boucle de production d'ammonium (NH_4^+) à un taux plus important que la métabolisation de ceux-ci par les AOB. Ainsi, à l'issue des résultats de l'article 2, il est suggéré de maximiser le processus de nitrification en limitant les activités métaboliques parallèles des *Nitrospira*. Il reste cependant à déterminer avec plus de précision les paramètres, tels que la charge hydraulique superficielle et la charge massique, pouvant limiter ces activités parallèles. Finalement, en dépit du taux de nitrification atteint lors des différents essais (17, 49 et 21 %), les résultats ont démontré une amélioration significative du taux d'enlèvement des paramètres intégrateurs de DOB_5C et de DCO dans les cellules testées par rapport aux cellules de contrôle.

6.1.3 Synthèse article 3 : Approches opérationnelles favorisant la nitrification

Les travaux réalisés à l'article 3 abordaient l'effet des paramètres opérationnels d'un procédé de biofiltration sur le développement de la biomasse nitrifiante. Il s'agissait alors de cibler ces facteurs clés du système sur lesquels il était possible d'apporter des modifications pouvant orienter le traitement. Les articles 1 et 2 ont déjà identifié les paramètres d'aération soutenue, de modification des cycles de lavages et de réduction du débit comme ceux ayant une influence sur la qualité du traitement en générale, sur le développement du biofilm nitrifiant

ainsi qu'ultimement, sur le processus de nitrification. Ainsi, comme objectif de recherche 3, il s'agissait de déterminer lequel de ses paramètres opérationnels a le plus d'influence, selon quelle configuration, et ce que cela implique en termes d'augmentation en demande énergétique pour les exploitants d'ouvrages municipaux d'assainissement.

Les résultats des trois conditions d'essais testées ont démontré une amélioration du traitement quant à l'élimination des charges en DBO_5C et en DCO. Selon les critères de conception pour le procédé Biocarbhone®, ce type de traitement est en mesure d'atteindre des rendements d'enlèvement de la DBO_5C de 85 %. Les valeurs initiales d'abattements de DBO_5C répertoriées par la station se situaient en moyenne à 86 %. Lors des essais, l'enlèvement de la DBO_5C a atteint des valeurs de plus de 90 % dans la partie profonde de la cellule, ce qui devait favoriser le processus de nitrification spécifiquement dans cette zone de la cellule de traitement (Zhu & Chen, 2001). Malgré la croissance lente des bactéries nitrifiantes (Daims & Wagner, 2010), et considérant le fait que le biofiltre à l'étude ne traitait pas la charge azotée avant le démarrage des essais, la partie profonde a pu contribuer au traitement avec l'atteinte d'un enlèvement de 24,6 kg-N/d d'azote ammoniacal. Cela démontre la capacité de résilience des bactéries nitrifiantes et le fait qu'elles peuvent survivre à des conditions inhospitalières dans un biofilm pendant une longue période de temps.

Les résultats ont confirmé encore une fois l'importance de l'aération pour soutenir le processus de nitrification. Une certaine nitrification était attendue avec un résiduel d'oxygène dissous entre 2 et 3 mg- O_2 /L (Metcalf & Eddy, 2014). Toutefois, avec des valeurs de 2,5 mg- O_2 /L dans la partie supérieure du filtre, les résultats d'azote ammoniacal n'ont démontré aucune nitrification significative. Ainsi, il est suggéré que l'aération soit davantage soutenue dans un procédé à biomasse fixée par rapport à celui à biomasse en suspension. Les travaux de Li et Bishop (2004) soutiennent que les concentrations en oxygène peuvent rapidement devenir limitantes dans ce type de procédé, créant des zones anoxiques dans le biofiltre. Ainsi, Boller et al. (1994) a relevé que la concentration en oxygène dissous devrait plutôt se maintenir à 4 mg- O_2 /L pour un procédé à biomasse fixée. Les présents résultats sont en accord avec les observations relevées dans la littérature et démontrent que la concentration en

oxygène dissous devrait plutôt se situer à au moins 6 mg-O₂/L et même davantage (Holloway et al., 2008; Zhao et al., 2006). Comme les rampes d'aération sont situées vers le fond de la cellule de traitement (environ à 5,5'), c'est effectivement en cet endroit que la diffusion de l'oxygène dissous dans le milieu est à son maximum, ce qui favorise alors le processus de nitrification en profondeur.

Les essais sur les paramètres de lavages n'ont pas eu d'impact significatif sur l'enlèvement de la charge carbonée, mais ont démontré une différence à 4' de profondeur pour l'enlèvement de l'azote ammoniacal. La réduction du temps de lavage, de son intensité et de sa fréquence favoriserait ainsi le processus de nitrification avec des valeurs observées de 67,2 kg-N/d d'enlèvement dans la partie inférieure du biofiltre par rapport à la cellule de contrôle. Selon les observations rapportées aux articles 1 et 2 et selon Lee et al. (2006), cela contribuerait au développement des bactéries nitrifiantes, en particulier en profondeur dans la cellule de traitement où le biofilm bactérien est à son plus mince (Boller et al., 1994; Torresi et al., 2016).

Les résultats des essais de réduction du débit sont en accord avec les observations de Nogueira et al. (2002) qui démontre que l'augmentation du temps de rétention hydraulique dans le biofiltre semble être insuffisante pour l'amélioration significative du traitement de la charge carbonée et azotée. Toutefois, les données montrent que la concentration d'oxygène dissous dans la cellule testée est significativement plus élevée que dans la cellule contrôle. Cela démontre que l'augmentation du temps de rétention hydraulique favoriserait la diffusion de l'oxygène dissous dans le liquide interstitiel. Le contrôle du temps de rétention hydraulique semble être un paramètre d'intérêt pouvant maximiser la diffusion de l'oxygène dissous dans le milieu dans ce type de procédé corroborant ainsi les observations rapportées par Meng et al. (2007) sur le lien entre ces deux paramètres.

En résumé, les résultats de travaux de recherche de l'article 3 ont démontré une meilleure capacité de traitement pour la charge carbonée lors des essais sur l'aération et la modification des paramètres de lavages. De plus, le processus de nitrification a été observé lors de ces

essais alors que le procédé n'était pas en mesure de nitrifier durant la période qui précédait. L'élément clé ressortant des essais semble être la concentration d'oxygène dissous disponible dans le milieu. Cette concentration augmente avec l'intensité de l'aération et est également liée au temps de rétention hydraulique. Elle devrait être d'au moins 6 mg-O₂/L pour assurer une bonne nitrification dans le lit filtrant. Il apparaît ainsi en toute logique que la partie profonde du filtre biologique est celle à optimiser pour l'enlèvement de la charge azotée puisque c'est à ce niveau que la charge carbonée est à son plus faible (plus de 90 % d'enlèvement) et que la concentration d'oxygène dissous est la plus élevée. Finalement, l'apport énergétique supplémentaire, évaluée selon les ratios rapportés par Mohapatra (2010) pour l'obtention de ces critères opérationnels dans les cellules test par rapport aux cellules de contrôle, se situerait entre 69 et 407 kWh/kg/d. Ces valeurs n'incluent pas l'augmentation de la production de boues qui devra également être considérée dans le calcul des coûts d'opération en fonction du taux d'enlèvement de la DBO₅.

6.1.4 Recommandations opérationnelles pour les procédés à biomasse fixée

Comme il a été démontré dans les articles, les changements opérationnels effectués ont eu un effet sur la population bactérienne nitrifiante, le processus de nitrification, l'enlèvement de la charge carbonée et donc, sur les performances de traitement en générale. Toutefois, ces modifications opérationnelles s'accompagnent de coûts énergétiques supplémentaires pour les ouvrages d'assainissement. Ainsi, en vue de répondre le plus efficacement possible aux besoins de traitement afin de minimiser les inconvénients associés à l'augmentation des besoins énergétiques, une liste de recommandations opérationnelles est suggérée et est spécifique pour les systèmes de type Biocarbone®, mais pourrait être extrapolée vers les systèmes de type biomasse fixée en général en respectant la même logique établie dans la présente étude.

Ainsi, l'aération se trouve à être un paramètre clé pour favoriser d'une part le développement des bactéries nitrifiantes AOB et NOB et, d'autre part, afin d'assurer une efficacité constante du processus de nitrification. Les résultats démontrent que le biofilm bactérien autotrophe

reprend rapidement une activité significative lorsque la concentration d'oxygène dissous augmente dans le liquide interstitiel. Afin d'assurer un bon rendement pour la nitrification dans un BAF, il est suggéré de cibler une valeur minimale de 6 mg-O₂/L dans le média filtrant, et ce, surtout dans sa zone profonde. Des sondes permanentes d'oxygène dissous pourraient ainsi être installées dans la partie profonde des cellules de traitement afin d'éviter une injection excessive d'air susceptible d'engendrer des problèmes de colmatage en surface du filtre. De plus, il apparaît que lorsque l'oxygène dissous est en concentration suffisante dans le milieu, la population de NOB a une préférence métabolique pour le nitrite et donc, assure un bon rendement de nitrification. Il semble ainsi que lorsque l'oxygène dissous vient à manquer (et ne diffuse pas suffisamment dans le biofilm), les NOB optent pour d'autres voies métaboliques pouvant contrebalancer le bilan azoté anticipé. C'est d'ailleurs à ce moment que les NOB, en raison de leur polyvalence, prédomineraient les AOB dans le biofilm, ce qui constituerait alors un indicateur d'une aération probablement insuffisante.

Avec l'aération, les lavages des filtres semblent être un paramètre efficace pour favoriser la nitrification. Ainsi, la stratégie à adopter serait de miser sur des cycles de lavages plus courts et moins intenses afin de dégager les matières accumulées par la filtration, mais de limiter au strict nécessaire le détachement du biofilm bactérien. En effet, les résultats démontrent qu'un lavage moins intense favorise le développement des bactéries nitrifiantes possiblement parce que celles-ci demeurent fixées en grande majorité au matériau de support (média) alors que les bactéries hétérotrophes sont emportées par les forces de cisaillements. Les images confocales suite aux analyses FISH (non présentées) confirment que le biofilm en profondeur a une épaisseur moyenne de 50 µm et qu'en surface, l'épaisseur moyenne surpasse souvent les 100 µm. L'objectif à atteindre est une durée de lavage suffisante pour dégager le maximum de matières accumulées, l'excédent de biomasse (surtout dans la partie supérieure du lit filtrant), sans complètement lessiver la biomasse produite. Cela permet ainsi de maintenir la flore bactérienne en constante activité de développement et donc, de maximiser leur aptitude à consommer les polluants pour assurer leur croissance. Les résultats des présents travaux suggèrent qu'une augmentation du nombre de lavages d'environ 25 % (en réduisant le délai entre deux lavages, mais également la durée du lavage air/eau) permet un bon

fonctionnement de l'ensemble du traitement tout en augmentant le potentiel de nitrification d'environ 40 %, et ce, dans un biofiltre qui n'était pas en mesure de soutenir une nitrification avant les périodes d'essais.

Finalement, l'augmentation du temps de rétention hydraulique et, conséquemment, du temps de contact de l'eau usée avec les microorganismes du biofilm, ne semble pas avoir eu d'effet significatif sur le traitement carboné et azoté en général (cellule d'essais vs cellule de contrôle). De meilleurs enlèvements ont toutefois été enregistrés en comparaison avec les données antérieures de la station. Les résultats des articles 1 et 2 démontrent bien que ce changement opérationnel favorise tout de même le développement des bactéries nitrifiantes. L'augmentation du temps de rétention présente ainsi un potentiel à considérer. L'article 3 a mis en exergue l'effet de ce paramètre sur la concentration en oxygène dissous dans le milieu. En réduisant la vitesse d'écoulement au travers le biofiltre et étant un procédé à contre-courant, l'augmentation du temps de contact de l'air favorise ainsi la diffusion d'oxygène dans le milieu. Il est donc suggéré d'instaurer un contrôle réglable du débit pouvant être envoyé sur les cellules de traitements afin de maximiser la diffusion d'oxygène dissous dans le milieu et ainsi optimiser l'énergie consommée pour le transfert d'oxygène. Un contrôle modulable du débit assurerait une meilleure gestion de la biofiltration et pourrait être employé lorsque nécessaire.

6.2 Limites et portée des résultats

Les travaux de recherche réalisés ont permis de conclure qu'il était possible, par le biais de modifications opérationnelles, de favoriser le développement d'une biomasse spécifique dans un procédé de biofiltration en vue de tendre vers des objectifs épuratoires allant au-delà de ceux prévus lors de la conception initiale. Toutefois, l'approche utilisée lors des présents travaux, bien qu'elle repose essentiellement sur des méthodes et outils reconnus, possède certaines limites qu'il convient de souligner afin de mieux remettre en contexte les résultats obtenus et éventuellement orienter de nouvelles pistes de recherche.

6.2.1 L'approche par qPCR et amorce dégénérée

Comme il a été précédemment mentionné, l'utilisation de la technique par PCR en temps réel ou par qPCR demande habituellement un contrôle rigoureux afin d'éviter les mésappariements des amorces d'oligonucléotides vers d'autres sites spécifiques que ceux préalablement et dûment sélectionnés. Ainsi, cette méthode souffre de ses nombreuses contraintes et tend peu à peu à être remplacée par d'autres techniques, tels que le pyroséquençage, pour l'analyse d'échantillons environnementaux complexes et hétérogènes. Cependant, le pyroséquençage est particulièrement coûteux comme méthode d'analyse et est donc, pour ces raisons, rarement utilisées dans un contexte d'analyse de routine ou pour des fins de renseignement par les exploitants d'ouvrages municipaux d'assainissement (Zhou et al., 2010). La qPCR reste donc un choix intéressant et peu coûteux dans ce contexte. La méthode ainsi utilisée dans les présents travaux a été adaptée dans son approche afin d'élargir son spectre d'analyse parmi les espèces bactériennes ciblées, et ce, dans l'optique de minimiser les contraintes imposées par une méthode dont les contrôles se doivent d'être rigoureux. En effet, étant donné que la qPCR classique requiert une analyse *post*-PCR afin de valider la séquence amplifiée pour l'identification de l'espèce ciblée, la méthode employée évite tous les problèmes associés à un mauvais appariement des amorces. Ainsi, les amorces dégénérées sont habituellement évitées. Les actuels travaux ont alors adopté une approche qui ne vise pas à calculer avec précision la quantité exacte de bactéries ciblées. L'approche avait pour but de définir une estimation de la présence d'un groupe de bactéries au sein d'un biofilm complexe. Ainsi, l'approche par amorce dégénérée s'avère particulièrement intéressante, car cela permet de couvrir un plus grand spectre d'espèces pouvant avoir quelques différences évolutives dans les paires de bases constituant le secteur génomique ciblé. Cela signifie que les résultats de qPCR produits et présentés dans les articles 1 et 2 n'ont pas été vérifiés par analyse *post*-PCR pour en déduire le séquençage exact, car il était déjà assumé que plusieurs espèces bactériennes pouvant répondre aux critères sélectionnés pouvaient avoir été détectées par cette approche. Les contrôles *post*-PCR effectués dans les présents travaux ont consisté une électrophorèse sur gel classique (Figure 6.5). Cela permettait d'observer qu'il y avait bien une seule bande correspondant à la section d'ADN

amplifié, et ce, aux nombres de paires de bases escomptées. Tous les échantillons ne respectant pas ces critères ont été exclus. Cela a permis en quelque sorte de contourner une contrainte imposée par la technique qPCR. Nonobstant cela, il s'avère certainement préférable d'augmenter les contrôles par une analyse d'un échantillon possédant un nombre connu d'espèces de bactéries nitrifiantes dans une solution hétérogène comportant également plusieurs espèces de bactéries hétérotrophes. Ainsi, la comparaison entre les paires d'amorces dégénérées proposées dans les présents travaux et celles non dégénérées utilisées dans la littérature permettrait de définitivement trancher sur cette question.

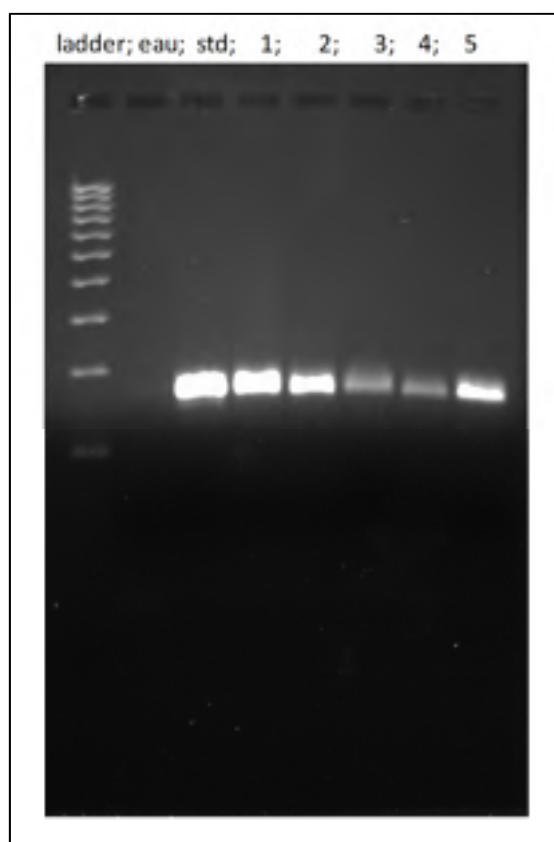


Figure 6.5 Contrôle post-PCR par électrophorèse sur gel

La figure 6.5 présente le résultat d'une électrophorèse sur gel. Les huit puits contenaient (de gauche à droite) une échelle correspondant à des pas de 100 pb, un échantillon d'eau sans ADN, un échantillon positif standard contenant l'amplicon d'ADN recherché, et une série

d'échantillons provenant des différents essais à contrôler. L'intensité de la bande est proportionnelle à la quantité d'ADN présente. Ces essais correspondent à l'amplification des segments d'ADN pour le gène ARNr-16S.

6.2.2 Sites des points d'échantillonnage

Comme le montre la figure 3.1 représentant respectivement la station d'épuration à l'étude ainsi que les points d'échantillonnage sélectionnés pour le schiste et l'eau usée, ceux-ci ont été positionnés en périphérie de la cellule de traitement plutôt qu'en son centre. Cette disposition est une résultante de contraintes physiques en station. Toutefois, comme la cellule est complètement submergée en mode fonctionnement avec maintien d'une couche d'eau de 0,3 à 1,2 m (qui assure sa distribution à la surface du filtre), et vu que les points d'échantillonnage sont situés à 0,4 m du périmètre extérieur, il s'avère peu probable que les résultats aient été influencés par leur positionnement.

6.2.3 Analyses FISH

Pour les mêmes raisons évoquées pour la qPCR, les analyses FISH par microscopie confocale doivent être contrôlées pour démontrer que les cellules marquées sont bien celles que l'on voulait étudier. Or, ce test est particulièrement coûteux (microscope confocale, produits chimiques, amorces d'oligonucléotides couplées à des marqueurs fluorescents) et ne peut donc pas être employé comme analyse de routine par les exploitants d'ouvrages municipaux en assainissement. Les analyses FISH effectuées dans la présente recherche avaient pour but de donner une idée de l'organisation spatiale du biofilm nitrifiant, et non dans l'optique de fournir une quantité précise d'organismes ainsi marqués. La technique, inspirée de l'ICQ (*Intensity correlation quotient*) par couplage d'intensité lumineuse sur le volume de la biomasse, permettait d'établir, dans les grandes lignes, si une tendance était mesurable et si celle-ci correspondait aux résultats obtenus par qPCR. Une batterie de contrôles avec plusieurs paires d'amorces reconnus aurait pu valider la spécificité de ceux-ci. Cependant, la conception de ces amorces avec fluorochrome a été effectuée suivant la même approche que pour les amorces qPCR dégénérées. Un maximum d'espèces différentes, mais

d'une même famille, a ainsi été aligné afin de sélectionner une portion de gène sur la séquence ARNr-16S recoupant toutes les espèces sans distinction.

6.2.4 Changements opérationnels

Les changements opérationnels proposés dans le cadre des présents travaux, bien qu'inspirés par la littérature, reposaient essentiellement sur la flexibilité opérationnelle d'un biofiltre. En effet, les changements opérationnels proposés pour favoriser la nitrification et le développement des bactéries nitrifiantes devaient être réalisables à pleine échelle. Il est probable que les recommandations opérationnelles ne puissent pas être appliquées dans un contexte où ces paramètres ne pourraient pas être modifiés dans certains systèmes de biofiltration, auquel cas, il faudrait les adapter selon les limites et les contraintes imposées par ces stations.

6.2.5 La biofiltration

La présente étude a été menée sur un procédé de type biofiltration submergée, le Biocarbone®, qui présente des contraintes, des limites et des forces qui se distinguent d'autres systèmes de biofiltration. Ainsi, les tendances obtenues sur l'augmentation des rendements épuratoires pourraient ne pas être les mêmes pour un autre procédé de traitement de type biofiltration. Cependant, si la logique opératoire reste la même, les effets présentés aux articles 1, 2 et 3 qui découlent de l'hypothèse de recherche devraient *a priori* évoluer dans le même sens avec des résultats positifs pour l'enlèvement des nutriments carboné et azoté.

De plus, le contexte de station (vs pilote) comporte certaines incertitudes. En effet, puisque plusieurs paramètres demeurent incontrôlés, il devient plus difficile d'élaborer un protocole qui est représentatif de la démonstration souhaitée. Tout changement apporté s'opère lentement et les analyses doivent s'étendre sur de longue période de temps afin que les différences entre les échantillons testés et ceux de contrôle soient uniquement issues des paramètres évalués. Dans le cas présent, une méthodologie adaptée aux contraintes de station

a permis d'assurer l'obtention de résultats visant à isoler les effets des modifications opérationnelles étudiées.

6.2.6 Portée des résultats

Les performances de traitement relevées dans la cadre de cette recherche démontrent, d'une part, que les procédés de biofiltration présentent une capacité épuratoire remarquable et, d'autre part, que leurs processus biologiques peuvent encore être améliorés. Peu de recherches ont été publiées sur les biofiltres puisque ceux-ci, en raison de la difficulté à être opéré de façon optimale, ont été supplantés par d'autres types de systèmes de traitement. Les résultats présentés dans cette thèse présente une portée pour tous ceux qui ont à opérer un procédé de type biomasse fixée submergée et qui ont le souci d'améliorer leur traitement en vue de faire de la nitrification ou tout autre processus biologique. En effet, les modifications opérationnelles présentées ont été centrées vers un même objectif, la nitrification. Si l'objectif de traitement avait été différent, les modifications opérationnelles devraient alors être reconsidérées.

Dans un contexte où le procédé de biofiltration Biocarbonate® ne permettait pas d'opérer une nitrification avant les essais, un enlèvement de 40 % d'azote ammoniacal a pu être obtenu, et ce, par l'action peu coûteuse d'opérer le procédé différemment. Ainsi, d'autres ouvrages municipaux ou industriels ayant un système de traitement biologique de type biomasse fixée submergée peuvent opter pour la même stratégie ou l'adapter à leurs besoins spécifiques. Si l'on suppose que les relations qui existent entre les différentes espèces microbiennes occupant le biofilm se ressemblent d'un biofiltre submergé à un autre, l'approche proposée devrait logiquement conduire à des performances améliorées des procédés similaires, voire meilleures que celles obtenues dans le cadre du présent projet.

6.3 Perspectives de recherche

La présente recherche a mis en évidence l'amélioration des performances épuratoires d'une station biologique de type biomasse fixée submergée par le biais de modifications

opérationnelles. De ce fait, les résultats ont également démontré que ces améliorations peuvent favoriser le développement de la microflore bactérienne responsable de la nitrification. Ces microorganismes ont été identifiés par le biais d'analyse qPCR par amorce dégénérée et le couplage des résultats de présence relative avec celles des paramètres physico-chimiques a pu mettre en évidence le fait que le nombre de bactéries présentes n'est pas toujours garant d'un meilleur rendement épuratoire. De ces résultats, différentes voies de recherche apparaissent comme pertinentes pour d'éventuels travaux sur le sujet, dont, entre autres : 1) étude d'un procédé de biofiltration intégrant dans sa phase de conception les différentes recommandations de la présente thèse; 2) étude portant sur les NOB dans un biofilm nitrifiant dans l'optique de déterminer les paramètres favorisant leur développement dans le biofilm en comparaison avec les AOB; 3) comme la présence des organismes commamox pourrait probablement jouer un rôle prépondérant dans le cycle de l'azote, définition avec plus de précision de la présence de ces organismes dans les systèmes de traitement biologique.

6.3.1 Conception d'un procédé biologique de type biomasse fixée intégrant les recommandations favorisant le développement de la flore nitrifiante

Une perspective de recherche ayant des applications directes sur le marché consisterait à prévoir des essais pilotes de biofiltration intégrant les différentes recommandations issues de cette thèse. L'épaisseur du média filtrant ne semble pas être mise en cause puisqu'elle permet à la fois d'assurer l'enlèvement de la charge carbonée dans sa partie supérieure et la nitrification biologique en profondeur. L'aération, paramètre clé de ce procédé, pourrait être ajustée grâce à un suivi en temps réel dans la partie profonde du filtre afin d'assurer dans cette zone une concentration d'au moins 6 mg-O₂/L. L'instauration d'une vanne de contrôle pouvant ajuster le débit entrant dans les cellules de traitements pourrait également s'avérer une autre avenue à explorer afin d'assurer des conditions favorables au transfert et à la diffusion d'oxygène tout en améliorant le traitement global.

Une autre voie particulièrement intéressante serait d'élaborer une stratégie pour inclure le développement d'une flore dénitrifiante au système avec des cycles « aération/mise en

attente ». En effet, il pourrait être envisageable de prévoir une boucle de recirculation assurant le retour des eaux chargées en nitrates en tête de procédé lorsque la cellule est en attente (sans aération) pour ainsi les dénitrifier dans la partie supérieure du biofiltre, endroit où la charge organique le permettrait. Cette piste de recherche assurerait un procédé hautement performant répondant aux besoins en matière d'enlèvement de la charge azotée.

6.3.2 Études approfondies sur le rôle des NOB et l'implication des *Nitrospira* de type *commamox*

Tel que présenté dans la littérature, les bactéries de types NOB ont tendance à être largement dominantes par rapport aux AOB. Les présents travaux ont montré des enlèvements prometteurs d'azote ammoniacal alors que les NOB observées se retrouvaient en proportions relatives inférieures par rapport aux AOB. Ces résultats obtenus avec des proportions moindres de NOB justifient de poursuivre les travaux de recherche sur le développement des NOB afin de mieux contrôler leur présence de manière à favoriser l'obtention de meilleures performances de traitement. De plus, la présence de *commamox* dans le biofilm bactérien pourrait également être une espèce clé dans les biofilms nitrifiants puisque ceux-ci ont la capacité d'assurer la nitrification aérobie complète.

Il serait également pertinent de confirmer l'utilisation des amorces dégénérées lors des évaluations sommaires des populations bactériennes. Malgré le fait que les présents travaux aient démontré l'intérêt lié à leur utilisation, une simplification de la technique tout en conservant la rigueur de l'approche permettrait éventuellement de devenir un paramètre analytique clé pour aider les exploitants de station à cultures fixées à améliorer les performances de traitement des ouvrages municipaux d'assainissement.

Une dernière voie de recherche réside dans le fait d'envisager une même stratégie que celle adoptée dans le cadre des présents travaux, mais concernant par exemple l'enlèvement du phosphore ou d'autres contaminants dans un procédé de type biomasse fixée. Ainsi, l'approche expérimentale permettrait de corroborer l'hypothèse fondamentale qui veut que tout traitement biologique puisse être conditionné vers une qualité de traitement spécifique si

les paramètres opérationnels permettent de modifier l'équilibre microbologique du processus.

CONCLUSION

Les présents travaux de thèse visaient à évaluer la possibilité de favoriser le développement d'une biomasse nitrifiante présente au sein d'un biofilm fixé d'un procédé de biofiltration à pleine échelle (Biocarbone®) afin d'en améliorer les performances de nitrification grâce à la modification de ses paramètres opérationnels (condition d'aération à 3000 m³/h, paramètre modifié de lavage plus court et plus fréquent, ajustement du débit afin d'augmenter le temps de rétention hydraulique). Ces changements opérationnels ont été sélectionnés en raison de leur influence appréhendée respective sur la croissance bactérienne au sein d'une station d'épuration des eaux usées. L'oxygène dissous dans le milieu liquide interstitiel et conséquemment au sein du biofilm joue un rôle important dans le processus de nitrification, alors que le lavage à contre-courant affecte directement la population bactérienne. Le débit d'eau usée dirigé sur les cellules affecte directement le temps de rétention hydraulique, la charge superficielle ainsi que la charge en nutriments pour les bactéries. Le postulat de base posé est que ces paramètres, lorsque modifiés pour des besoins spécifiques tels que la nitrification, devraient favoriser le développement des bactéries nitrifiantes dans le biofilm et, par la même occasion, favoriser le processus de nitrification dans le procédé. Pour arriver à démontrer la véracité de ce postulat, des analyses de la population bactérienne a été effectuées (par qPCR avec amorces dégénérées et test FISH par imagerie confocale) sur des échantillons de biofilm prélevés à différentes profondeurs (1', 2', 4' et 5') dans le biofiltre.

Le suivi du développement des bactéries en fonction des différentes profondeurs du biofiltre a permis de mieux cibler les effets des différents changements opérationnels tout au long du média filtrant. Ces réponses ont ainsi permis de mieux comprendre le développement du biofilm dans ce type de procédé afin de mieux en mesurer les impacts opérationnels et en assurer un meilleur contrôle. Parallèlement aux analyses microbiologiques, des analyses d'échantillons d'eaux prélevés aux mêmes profondeurs ont été effectuées (DCO, CDBO₅, N-NH₄⁺, NO₃⁻, NT, alcalinité, O₂, sulfures). Ces analyses ont mis en évidence le rôle du biofilm et du média filtrant dans l'enlèvement des contaminants carbonés et azotés. Ces analyses ont

également permis de confirmer ou non le processus de nitrification, tout en comparant les rendements d'épuration obtenus avec ceux antérieurs de la station.

Principaux résultats

Les résultats sur l'effet de l'augmentation de l'aération dans les cellules tests ont démontré un accroissement de la présence relative des bactéries nitrifiantes par rapport à la population bactérienne, surtout dans la portion profonde de la cellule de traitement. Ainsi, les valeurs obtenues des AOB par rapport à la population bactérienne atteignent 0,50 % dans la cellule test comparativement à 0,074 % dans la cellule de contrôle. En ce qui concerne la présence relative des NOB, les résultats démontrent une valeur de 0,033 % dans la cellule test et 0,005 % dans la cellule de contrôle. Ces résultats illustrent l'effet de l'aération sur la population de bactéries nitrifiantes confirmant le postulat de l'importance de ce paramètre pour le développement et le maintien de ces bactéries. Ces résultats démontrent également la résilience de ces microorganismes. En effet, leur présence a été confirmée dans les cellules de contrôle alors qu'elles avaient été opérées pendant plusieurs mois en condition anaérobie, conditions qui s'avèrent particulièrement inhospitalières pour le développement des bactéries nitrifiantes.

Les résultats sur l'effet des modifications des paramètres de lavages (plus court, moins intense, mais plus fréquent) ont également favorisé la population relative des bactéries nitrifiantes par rapport aux bactéries totales. Les AOB ont été évaluées à 0,21 % dans la cellule test et 0,11 % dans la cellule contrôle. La présence des NOB a été respectivement évaluée à 0,046 % et 0,006 % dans les cellules tests et de contrôle. Ces cycles de lavages, favorisant le maintien d'un biofilm mince, confèrent aux bactéries nitrifiantes une opportunité dans la compétition inter-espèces pour l'occupation de l'espace dans la matrice biologique.

Finalement, les résultats sur l'effet de la limitation du débit ont démontré une augmentation de la présence de la population relative des AOB par rapport à celle bactérienne, avec 0,58 % dans la cellule test contre 0,19 % dans la cellule de contrôle. Quant aux NOB, les résultats

illustrent un accroissement substantiel de la présence des NOB par rapport à celle des AOB dominant ainsi largement la population nitrifiante avec 6,3 % de présence relative dans le biofilm bactérien. Ces observations sont en accord avec celles rapportées par la littérature scientifique. Il est intéressant de noter que la population bactérienne en générale, évaluée par les amorces ARNr-16S, ne s'est pas développée de façon significative lors de ses essais. Cela qui tend ainsi à démontrer que, par l'analyse de la population bactérienne seule, les effets favorables sur les organismes nitrifiants passeraient inaperçus.

En ce qui concerne la corrélation des résultats entre la présence relative des bactéries nitrifiantes et le rendement épuratoire du biofiltre, les données recueillies ont démontré des résultats surprenants. Les meilleurs abattements de la matière carbonée et azotée ne sont pas nécessairement obtenus avec les valeurs observées les plus élevées de présence de AOB et de NOB. Par ailleurs, ceux-ci, présents même en faible proportion par rapport à l'ensemble du biofilm, ont été en mesure d'atteindre un taux de nitrification de 17 % dans la cellule test après des mois d'inactivité. Il apparaît également que le lavage est particulièrement efficace comme outil de contrôle pour le développement de la biomasse nitrifiante. En effet, la gestion des lavages assure un maintien des bactéries en phase de développement au sein du biofilm. Celui-ci étant régulièrement soumis à des forces de cisaillement lors du lavage des filtres à contre-courant, il ne peut pas se développer jusqu'à maturité. Ainsi, le biofilm demeure mince et les microorganismes demeurent alors plus actifs afin d'assurer leur développement et leur épaissement. Cela présente comme conséquence d'augmenter le rendement épuratoire pour l'enlèvement des charges carbonées et azotées. Les résultats d'enlèvement d'azote ammoniacal ont atteint 49 % par rapport à une population bactérienne nitrifiante de moins de 0,04 % dans le biofilm. Ici encore, l'impact le plus important sur le développement bactérien ainsi que sur le traitement en général a été observé dans la partie profonde de la cellule de traitement. Les études antérieures sur le dénombrement des AOB et NOB s'étaient intéressées à la donnée quantitative de ces espèces, mais sans en faire de liens avec l'efficacité du traitement. Or, les présents travaux concluent que le lien entre la présence relative des AOB et NOB et le traitement n'est pas linéaire.

D'autres facteurs entrent également en jeu et affectent la performance du traitement par biofiltration. Les essais d'ajustement du débit ont mené aux résultats les plus élevés observés pour le développement de la population relative des nitrifiantes. En particulier, les NOB ont largement dominé le biofilm nitrifiant avec 0,18 % de présence relative contre 0,034 % pour les AOB. Ces résultats sont en accord avec la littérature. Cependant, le processus de nitrification ne s'est pas amélioré pour autant dans le procédé, atteignant un rendement de seulement 21 %. Ainsi, l'augmentation du temps de résidence hydraulique affecte positivement le développement des AOB et particulièrement des NOB, mais ce paramètre à lui seul ne peut assurer un contrôle satisfaisant du processus de nitrification.

Concernant les enjeux opérationnels pour les exploitants des ouvrages municipaux d'assainissement, les différents essais ont présenté une estimation en coût énergétique pour l'amélioration des performances de la biofiltration. Les principaux résultats ont démontré que les modifications opérationnelles testées ont toutes amélioré le traitement de la charge carbonée. Ces modifications ont également favorisé le développement de la biomasse nitrifiante, en plus de maintenir des conditions propices au processus de nitrification dans un système où les conditions étaient initialement non favorables.

À la lumière des résultats obtenus suite au suivi des paramètres opérationnels de débit, d'oxygène dissous ainsi que des paramètres physico-chimiques, le paramètre clé dans le contrôle de la nitrification dans un système de type biomasse fixée s'avère la teneur en oxygène dissous. Ces observations confirment ce qui a été soulevé dans la littérature concernant les rendements de nitrification d'une biomasse fixée où la teneur en oxygène dissous proposé dans le liquide interstitiel devrait être de 4 à 6 mg-O₂/L. Les résultats obtenus lors des présents travaux suggèrent le maintien d'une concentration d'oxygène dissous de 6 mg-O₂/L, mais dans la partie profonde du biofiltre. Ainsi, l'installation d'une sonde d'oxygène dissous dans cette partie de la cellule de traitement assurerait un meilleur contrôle de la concentration, et ce, également, dans une perspective d'économie d'énergie.

Considérant les résultats obtenus lors des présents essais, l'apport supplémentaire en énergie en fonction de l'enlèvement de la CDBO₅, du N-NH₄⁺ nitrifié et de l'augmentation des lavages, lorsque comparé entre les cellules test et de contrôles, se situerait entre 69 et 407 kWh/kg/d. Ainsi, afin de favoriser le processus de nitrification dans un système BAF qui n'a pas été conçu à cet effet, une aération soutenue dans la partie profonde du filtre ainsi que des lavages plus courts et plus fréquents sont recommandés. Quant à l'ajustement du débit, il permet une flexibilité quant au contrôle des charges organiques dirigées sur les cellules de traitement et la disponibilité d'oxygène dissous pour le biofilm. Pour de meilleures performances de nitrification, l'augmentation du temps de rétention hydraulique est donc suggérée.

Travaux de recherche futurs

Les présents travaux de thèse ont permis un avancement des connaissances sur le comportement d'une biomasse fixée au sein d'un procédé de biofiltration à pleine échelle (Biocarbone®). Ces travaux ont ainsi exploré une voie analytique par qPCR afin d'évaluer rapidement et le plus largement possible la présence relative des espèces bactériennes d'intérêts. L'étude a également démontré les différents effets que peuvent engendrer des changements opérationnels sur la biomasse responsable du traitement. Des travaux de recherche futurs pourraient être menés sur la comparaison entre les différentes amorces génétiques développées dans le cadre de la présente thèse et les amorces *amoA* et *nxrB* portant sur des espèces spécifiques telles que présentées dans la littérature. Par ailleurs, il serait certainement intéressant de centrer davantage les essais sur les NOB afin de mieux définir les critères favorisant leur présence supérieure aux AOB. En raison de ce qui a été présumé, c'est-à-dire que la nitrification est plus efficace lorsque les AOB fournissent la principale source de molécules intermédiaires pour les NOB, il devient alors d'intérêt de comprendre quelles sont les conditions influençant le développement des NOB et, par le fait même, leur indépendance métabolique à l'égard des AOB. Une piste de recherche intéressante pour les exploitants de stations interpellés par l'enlèvement de l'azote ammoniacal réside dans l'identification et l'évaluation du rôle des *Nitrospira comammox* au

sein de leur système biologique. En effet, ces bactéries pourraient jouer un rôle important et cela mérite d'être exploré. L'étude s'est intéressée davantage à la problématique de l'enlèvement de l'azote ammoniacal des eaux usées par nitrification, mais des recherches futures sur d'autres paramètres spécifiques tels que le phosphore, les phénols, les perturbateurs endocriniens ou autres contaminants persistants pourraient être menées. Finalement, étant donné que la présente thèse se concentrait essentiellement à définir les critères pouvant favoriser le développement microbien dans un contexte inadapté ainsi qu'en évaluer les performances de traitement, une perspective de recherche sur la conception d'une unité de traitement par biofiltration respectant les recommandations établies lors des présents travaux serait intéressante. Si lors de la conception la flexibilité opérationnelle est déjà considérée, le procédé de biofiltration pourrait sans doute s'avérer un système plus performant et fiable et, conséquemment, être mieux positionné sur le marché.

Applications à d'autres systèmes d'épuration à cultures bactériennes fixées

Les résultats et recommandations, bien qu'issus d'essais menés sur un système de traitement par biofiltration submergé de type Biocarbone®, pourraient être transposables à d'autres types de systèmes d'épuration à cultures bactériennes fixées. Ainsi, l'aération soutenue, le temps de contact avec le biofilm ainsi que les paramètres de lavage sont tous à considérer avec le même potentiel d'amélioration du traitement. De plus, l'approche préconisée a permis de démontrer qu'il est possible, par le biais de manœuvres simples et relativement peu coûteuses, de contrôler le traitement biologique pour l'obtention de meilleurs rendements. Il s'avère alors possible, selon les besoins spécifiques de traitement, de personnaliser les paramètres opérationnels pour atteindre cette finalité. Ainsi, cette approche pourrait être utilisée par les exploitants municipaux ou industriels qui souhaiteraient employer un traitement biologique à base de cultures fixées pour assurer l'assainissement des eaux résiduaires. Ce type de traitement pourrait ainsi être utilisé dans des contextes plus difficiles pour les microorganismes profitant de leur capacité de résilience et leur résistance face aux chocs toxiques et hydrauliques. Ceci permet ainsi une application élargie des traitements

biologiques à base de cultures bactériennes fixées vers le traitement potentiel de différents contaminants dont ceux récalcitrants.

ANNEXE I

RESULTS OF RELATIVE OVERALL PRESENCE OF BACTERIA (16Sr-RNA) WITHIN THE BIOFILM UNDER TESTING CONDITIONS WITH NEWLY DESIGNED QPCR PRIMERS (ARTICLE 1 and 2)

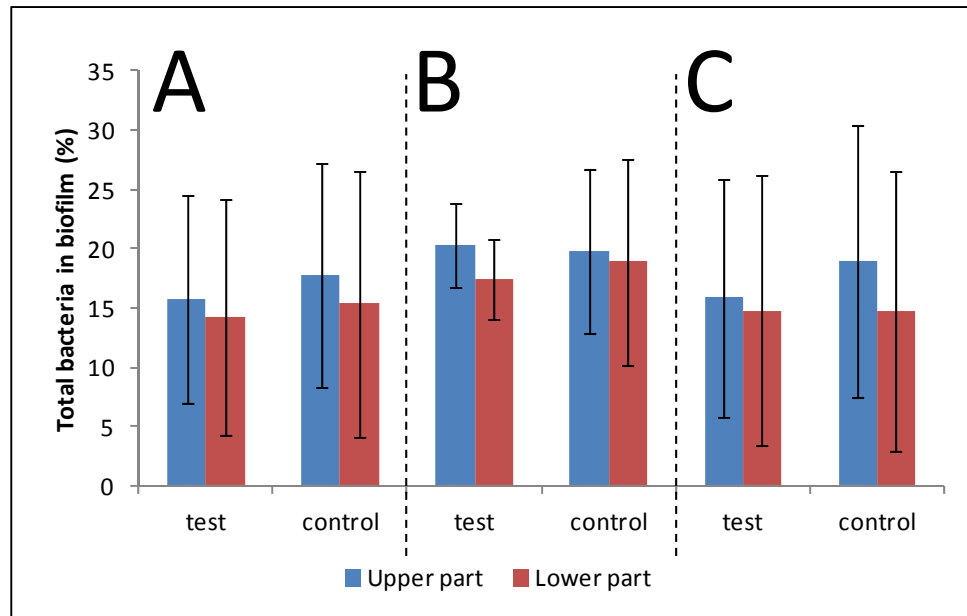


Figure A.1 Graph shown in (A) was obtained under aerobic testing condition (mean on 42 days), in (B) under modified backwash testing condition (mean on 31 days) and in (C), under inflow reduction testing condition (mean on 43 days). Details of these testing conditions can be found in the Material and Methods section. Upper part includes the 1' and 2' samples while the lower part includes the 4' and 5' samples. qPCR amplifications were done for 40 cycles as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min; denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 61.8 °C for 30 s and elongation at 75.5 °C for 30 s.

ANNEXE II

SPECIES AND PARTIAL NUCLEOTIDE GENE SELECTION FOR qPCR AND FISH ANALYSIS (ARTICLE 1)

16S rRNA ¹		AmoA ¹		NxrB ¹	
Species	Accession #	Species	Accession #	Species	Accession #
<i>Bacillus cereus</i>	HM989917.1	<i>Nitrosomonas europaea</i>	JN099309.1	<i>Nitrospira bockiana</i>	KC884861.1
<i>Bacillus polymyxa</i>	X57308.1	<i>Nitrosomonas europaea</i>	L08050.1	<i>Nitrospira calida</i>	KC884905.1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	KC789795.1	<i>Nitrosomonas marina</i>	AJ388586.1	<i>Nitrospira Ecomares</i>	KC884896.1
<i>Bacillus sp.</i>	AB665727.1	<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	AF272406.1	<i>Nitrospira marina</i>	KC884903.1
<i>Campylobacter sp.</i>	L04318.1	<i>Nitrosomonas urea</i>	AJ388585.1	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	KC884858.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	DQ411814.1	<i>unknown proteobacterium</i>	AJ388570.1		
<i>Escherichia coli</i>	KP941759.1	16S rRNA²			
<i>Escherichia vulneris</i>	KP941760.1	AOB		NOB	
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	NR_074313.1	<i>Nitrosomonas communis</i>	HE856821.1	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	L11661.1
<i>Nitrobacter vulgaris</i>	AM286398.1	<i>Nitrosomonas europaea</i>	HE862405.1	<i>Nitrobacter sp.</i>	L11662.1
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	AY055796.1	<i>Nitrosomonas eutropha</i>	AY123795.1	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	L11663.1
<i>Nitrobacter sp.</i>	AM286397.1	<i>Nitrosomonas ureae</i>	AJ298730.1	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	AY055796.1
<i>Nitrococcus mobilis</i>	NR_104912.1	<i>Nitrosomonas sp.</i>	AJ005546.1	<i>Nitrospira marina</i>	L35501.1
<i>Nitrosococcus halophilus</i>	NR_074790.1	<i>Nitrosomonas sp.</i>	AF272424.1	<i>Nitrospira sp.</i>	AJ224046.1
<i>Nitrosococcus oceanus</i>	M96395.1	<i>Uncultured AOB</i>	JN099284.1	<i>Nitrospira bockiana</i>	EU084879.1
<i>Nitrosococcus watsonii</i>	NR_074791.1			<i>Nitrospira calida</i>	HM485589.1
<i>Nitrosococcus sp.</i>	AF153343.1				
<i>Nitrosomonas europaea</i>	NR_074774.1				
<i>Nitrosomonas marina</i>	NR_104815.1				
<i>Nitrosomonas sp.</i>	NR_074682.1				
<i>Nitrospira defluvii</i>	NR_074700.1				
<i>Nitrospira moscoviensis</i>	NR_029287.1				
<i>Salmonella sp.</i>	AF130955.1				
<i>Staphylococcus sp.</i>	FR687206.1				
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KM888074.1				

Species selection for the design of primers used for (¹) qPCR analysis based on partial DNA sequence of gene of interest: total bacteria (16S-rRNA), AOB (amoA) and NOB (nxrB) in the biofilm and (²) confocal microscopy (FISH) based on partial DNA sequence of ribosomal gene 16S-rRNA for a selection of AOB and NOB species. Accession numbers are tied to the NCBI library.

ANNEXE III

TEMPLATE SPECIES AND PARTIAL NUCLEOTIDE GENE SELECTION FOR qPCR ANALYSIS (ARTICLE 2)

16S rRNA ¹		AmoA ¹		NxrB ¹	
Species	Accession #	Species	Accession #	Species	Accession #
<i>Bacillus cereus</i>	HM989917.1	<i>Nitrosomonas europaea</i>	JN099309.1	<i>Nitrospira bockiana</i>	KC884861.1
<i>Bacillus polymyxa</i>	X57308.1	<i>Nitrosomonas europaea</i>	L08050.1	<i>Nitrospira calida</i>	KC884905.1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	KC789795.1	<i>Nitrosomonas marina</i>	AJ388586.1	<i>Nitrospira sp. Ecomares</i>	KC884896.1
<i>Bacillus sp.</i>	AB665727.1	<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	AF272406.1	<i>Nitrospira marina</i>	KC884903.1
<i>Campylobacter sp.</i>	L04318.1	<i>Nitrosomonas urea</i>	AJ388585.1	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	KC884858.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	DQ411814.1	<i>unknown proteobacterium</i>	AJ388570.1		
<i>Escherichia coli</i>	KP941759.1				
<i>Escherichia vulneris</i>	KP941760.1				
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	NR_074313.1				
<i>Nitrobacter vulgaris</i>	AM286398.1				
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	AY055796.1				
<i>Nitrobacter sp.</i>	AM286397.1				
<i>Nitrococcus mobilis</i>	NR_104912.1				
<i>Nitrosococcus halophilus</i>	NR_074790.1				
<i>Nitrosococcus oceanus</i>	M96395.1				
<i>Nitrosococcus watsonii</i>	NR_074791.1				
<i>Nitrosococcus sp.</i>	AF153343.1				
<i>Nitrosomonas europaea</i>	NR_074774.1				
<i>Nitrosomonas marina</i>	NR_104815.1				
<i>Nitrosomonas sp.</i>	NR_074682.1				
<i>Nitrospira defluvii</i>	NR_074700.1				
<i>Nitrospira moscoviensis</i>	NR_029287.1				
<i>Salmonella sp.</i>	AF130955.1				
<i>Staphylococcus sp.</i>	FR687206.1				
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KM888074.1				

Species selection for the design of degenerated primers used for qPCR analysis based on partial DNA sequence of gene of interest: ¹)total bacteria (16S-rRNA), AOB (*amoA*) and NOB (*nxrB*) in the biofilm. Accession numbers are related with the NCBI library.

LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahn, S. J., Costa, J., & Rettig Emanuel, J. (1996). PicoGreen Quantitation of DNA: Effective Evaluation of Samples Pre-or Post-PCR. *Nucleic Acids Research*, 24(13), 2623-2625. doi:10.1093/nar/24.13.2623.
Repéré à <http://nar.oxfordjournals.org/content/24/13/2623.short>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC145983/pdf/242623.pdf>
- Antoniou, P., Hamilton, J., Koopman, B., Jain, R., Holloway, B., Lyberatos, G., & Svoronos, S. A. (1990). Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Water Research*, 24(1), 97-101. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90070-M](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(90)90070-M).
Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004313549090070M>
- Aoi, Y., Miyoshi, T., Okamoto, T., Tsuneda, S., Hirata, A., Kitayama, A., & Nagamune, T. (2000). Microbial ecology of nitrifying bacteria in wastewater treatment process examined by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(3), 234-240. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80075-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80075-4).
Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172300800754>
- Awolusi, O. O., Nasr, M., Kumari, S., & Bux, F. (2016). Artificial Intelligence for the Evaluation of Operational Parameters Influencing Nitrification and Nitrifiers in an Activated Sludge Process. *Microbial Ecology*, 72(1), 49-63. doi: 10.1007/s00248-016-0739-3. Repéré à <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0739-3>
- Bak, A. L., Christiansen, C., & Stenderup, A. (1970). Bacterial genome sizes determined by DNA renaturation studies. *Journal of General Microbiology* (1970), 64, 380.
- Baptista, J. D. C., Lunn, M., Davenport, R. J., Swan, D. L., Read, L. F., Brown, M. R., Curtis, T. P. (2014). Agreement between amoA Gene-Specific Quantitative PCR and Fluorescence In Situ Hybridization in the Measurement of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Activated Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(19), 5901-5910. doi: 10.1128/aem.01383-14.
Repéré à <http://aem.asm.org/content/80/19/5901.abstract>
- Barjenbruch, M. (2007). Benchmarking of BAF plants: operational experience on 40 full-scale installations in Germany. *Water Science and Technology*, 55(8-9), 91-98. doi: 10.2166/wst.2007.246
- Benidickson, J. (2011). *The Culture of Flushing: A Social and Legal History of Sewage*. UBC Press. Repéré à http://books.google.co.uk/books?id=_v0WjdM6sLoC

- Bernier, B., Dumoulin, P.-P., Paradi, D., & Tétreault, R. (2001). *Guide pour l'étude des technologies conventionnelles de traitement des eaux usées d'origine domestique*. Repéré à <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/eaux-usees/domestique/index.htm>.
- Blackall, L. L., & Burrell, P. C. (1999). The microbiology of nitrogen removal in activated sludge systems. Dans R. J. Seviour & L. L. Blackall (Éds.), *The Microbiology of Activated Sludge* (pp. 203-226). Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-011-3951-9_8. Repéré à http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-3951-9_8
- Blackburne, R., Vadivelu, V. M., Yuan, Z., & Keller, J. (2007). Kinetic characterisation of an enriched Nitrospira culture with comparison to Nitrobacter. *Water Research*, 41(14), 3033-3042. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.043>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135407000826>
- Blanco, C. (2010). *Suivi de la cinétique de croissance du biofilm généré dans un réacteur à biofilm à lit en mouvement (RBLM)* (École de technologie supérieure). Repéré à <http://espace.etsmtl.ca/id/eprint/629>
- Boller, M., Gujer, W., & Tschui, M. (1994). Parameters affecting nitrifying biofilm reactors. *Water Science and Technology*, 29(10-11), 1-11.
- Bourgeois, F.-R., Monette, F., & Cyr, D. (2018). Operation Modifications for the Development of Nitrifying Bacteria in a Large-Scale Biological Aerated Filter and its Impact on Wastewater Treatment. *Water Science and Technology*.
- Bourgeois, F.-R., Monette, F., Sades, L., & Daniel, C. (2018). Operational Modifications to Promote the Development of Nitrifying Biomass in a Non Nitrifying Biological Aerated Filter: Assessment with Degenerated qPCR Primers. *Water Research*.
- Bovendeur, J., Zwaga, A. B., Lobee, B. G. J., & Blom, J. H. (1990). Fixed-biofilm reactors in aquacultural water recycle systems: effect of organic matter elimination on nitrification kinetics. *Water Research*, 24(2), 207-213. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90104-E](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(90)90104-E). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004313549090104E>
- Camargo, J. A., & Alonso, Á. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32(6), 831-849. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412006000602>
- Canada, Environnement. (2001). *État des effluents urbains au Canada*. Bureau des indicateurs et de l'évaluation, Service de la conservation de l'environnement.
- Canada, Environnement. (2003). *Procédés de traitement pour l'enlèvement de l'ammoniac des eaux usées municipales* (Vol. 0-662-88410-8). ISBN.

- Canada, Environnement. (2012). *Effluent Regulations of wastewater sanitation systems (Règlement sur les effluents des systèmes d'assainissement des eaux usées)*. Ottawa: Gazette du Canada.
- Canada, Environnement (2012). Règlement sur les effluents des systèmes d'assainissement des eaux usées, 146 C.F.R. Lois sur les pêches.
- Canada, E. (2016). *Inventaire national des rejets de polluants (INRP) Bases de données téléchargeables*.
Repéré à www.ec.gc.ca/inrp-npri/default.asp?lang=Fr&n=0EC58C98.
- Canler, J.-P., Perret, J.-M., Lengrand, F., & Iwema, A. (2003). Nitrification in biofilters under variable load and low temperature. *Water Science and Technology*, 47(11), 129-136.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 278-288. doi: 10.1128/aem.01177-06. Repéré à <http://aem.asm.org/content/73/1/278.abstract>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797146/pdf/1177-06.pdf>
- Chandler, D. P. (1998). Redefining relativity: quantitative PCR at low template concentrations for industrial and environmental microbiology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(3), 128-140. doi: 10.1038/sj.jim.2900546. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.2900546>
<http://link.springer.com/article/10.1038%2Fsj.jim.2900546>
- Chandran, K., & Smets, B. F. (2000). Applicability of two-step models in estimating nitrification kinetics from batch respirograms under different relative dynamics of ammonia and nitrite oxidation. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(1), 54-64. doi: 10.1002/1097-0290(20001005)70:1<54::AID-BIT7>3.0.CO;2-H. Repéré à <https://www.cheric.org/research/tech/periodicals/view.php?seq=297378>
- Chen, S., Ling, J., & Blancheton, J.-P. (2006). Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 179-197. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.09.004>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144860905001263>
- Cohen, Y. (2001). Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*, 77(3), 257-274. doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00074-2). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852400000742>

- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., . . . Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504-509. doi: 10.1038/nature16461
<http://www.nature.com/nature/journal/v528/n7583/abs/nature16461.html#supplementary-information>. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1038/nature16461>
- Daims, H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (2001). In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol*, 67(11), 5273-5284. doi: 10.1128/aem.67.11.5273-5284.2001.
 Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93301/pdf/am1101005273.pdf>
- Daims, H., Nielsen, P., Nielsen, J., Juretschko, S., & Wagner, M. (2000). Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology. *Water Science and Technology*, 41(4-5), 85-90.
- Daims, H., & Wagner, M. (2010). The microbiology of nitrogen removal. Dans R. J. N. Seviour, P.H. (Éd.), *The microbiology of Activated Sludge*. (pp. 259-280). London, UK: IWA.
- de Beer, D., & Muyzer, G. (1995). Multispecies biofilms: report from the discussion session. *Water Science and Technology*, 32(8), 269-270.
 Repéré à <http://wst.iwaponline.com/ppiwawst/32/8/269.full.pdf>
- Devinny, J. S., & Ramesh, J. (2005). A phenomenological review of biofilter models. *Chemical Engineering Journal*, 113(2-3), 187-196. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2005.03.005>.
 Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894705001026>
- Dionisi, H., Layton, A., Robinson, K., Brown, J., Gregory, I., Parker, J., & Sayler, G. (2002). Quantification of *Nitrosomonas oligotropha* and *Nitrospira* spp. using competitive polymerase chain reaction in bench-scale wastewater treatment reactors operating at different solids retention times. *Water environment research*, 462-469.
- Dionisi, H. M., Layton, A. C., Harms, G., Gregory, I. R., Robinson, K. G., & Sayler, G. S. (2002). Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-Like Ammonia-Oxidizing Bacteria and *Nitrospira* spp. from Full-Scale Wastewater Treatment Plants by Competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 245-253. doi: 10.1128/aem.68.1.245-253.2002.
 Repéré à <http://aem.asm.org/content/68/1/245.abstract>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126567/pdf/0990.pdf>

- Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H., & Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A*, 51(2), 127-128; author reply 129. doi: 10.1002/cyto.a.10013.
Repéré à http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/cyto.a.10013/asset/10013_ft.pdf?v=1&t=i8x6iscs&s=1597b5085c2949dc393eaf26be3623f8bed1a2c0
- Driscoll, C. T., Whitall, D., Aber, J., Boyer, E., Castro, M., Cronan, C., . . . Ollinger, S. (2003). Nitrogen Pollution in the Northeastern United States: Sources, Effects, and Management Options. *BioScience*, 53(4), 357-374. doi: 10.1641/0006-3568(2003)053[0357:NPITNU]2.0.CO;2. Repéré à [http://dx.doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0357:NPITNU\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0357:NPITNU]2.0.CO;2)
<http://bioscience.oxfordjournals.org/content/53/4/357.full.pdf>
- Dryburgh, F.-J. (2011). *Estimation de la distribution et de l'abondance relative des bactéries nitrifiantes en comparaison avec la population bactérienne totale dans les étangs aérés de la station d'épuration des eaux usées municipales de Sainte-Marthe-du-Cap (Québec, Canada) à l'aide de la PCR en temps réel*. Québec, Canada: Innu-sience.
- Edwards, C. (1999). *Environmental monitoring of bacteria*. Methods in biotechnology, Humana Press.
- Falkentoft, C. M., Müller, E., Arnz, P., Harremoës, P., Mosbæk, H., Wilderer, P. A., & Wuertz, S. (2002). Population changes in a biofilm reactor for phosphorus removal as evidenced by the use of FISH. *Water Research*, 36(2), 491-500. doi: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00231-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00231-7). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135401002317>
- Feng, Y., Li, X., Song, T., Fan, L., Yu, Y., Qi, J., & Wang, X. (2017). Effect of backwashing on the microbial community structure and composition of a three dimensional particle electrode coupled with biological aerated filter reactor (TDE-BAF). *Ecological Engineering*, 101, 21-27. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.01.011>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925857417300113>
- Flemming, H. C. (2002). Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59(no. 6), pp. 629-640-2002 v.2059 no.2006. doi: 10.1007/s00253-002-1066-9
- Foesel, B. U., Gieseke, A., Schwermer, C., Stief, P., Koch, L., Cytryn, E., . . . Schramm, A. (2008). Nitrosomonas Nm143-like ammonia oxidizers and Nitrospira marina-like nitrite oxidizers dominate the nitrifier community in a marine aquaculture biofilm. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(2), 192-204. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00418.x. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00418.x>
<http://femsec.oxfordjournals.org/content/femsec/63/2/192.full.pdf>

- Fruhen, M., Böcker, K., Eidens, S., Haaf, D., Liebeskind, M., & Schmidt, F. (1994). Tertiary nitrification in pilot-plant plug-flow fixed-film reactors with long-term ammonium deficiency. *Water Science and Technology*, 29(10-11), 61-67.
- Gerardi, M. H. (2006). *Wastewater bacteria* (Vol. 5). John Wiley & Sons.
- Gieseke, A., Bjerrum, L., Wagner, M., & Amann, R. (2003). Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. *Environmental Microbiology*, 5(5), 355-369. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00423.x. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00423.x>
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-2920.2003.00423.x/abstract>
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., & Schramm, A. (2001). Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl Environ Microbiol*, 67(3), 1351-1362. doi: 10.1128/aem.67.3.1351-1362.2001.
Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92734/pdf/am001351.pdf>
- Gillis, M., Ley, J. D., & Cleene, M. D. (1970). The Determination of Molecular Weight of Bacterial Genome DNA from Renaturation Rates. *European Journal of Biochemistry*, 12(1), 143-153. doi: 10.1111/j.1432-1033.1970.tb00831.x.
Repéré à <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00831.x>
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30(6), 503-512. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8).
Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301472X02008068>
[http://www.exphem.org/article/S0301-472X\(02\)00806-8/abstract](http://www.exphem.org/article/S0301-472X(02)00806-8/abstract)
- Graham, D. W., Knapp, C. W., Van Vleck, E. S., Bloor, K., Lane, T. B., & Graham, C. E. (2007). Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *ISME J*, 1(5), 385-393.
doi: <http://www.nature.com/ismej/journal/v1/n5/supinfo/ismej200745s1.html>.
Repéré à <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2007.45>
<http://www.nature.com/ismej/journal/v1/n5/pdf/ismej200745a.pdf>
- Gruber-Dorninger, C., Pester, M., Kitzinger, K., Savio, D. F., Loy, A., Rattei, T., Daims, H. (2015). Functionally relevant diversity of closely related *Nitrospira* in activated sludge. *The ISME Journal*, 9(3), 643-655. doi: 10.1038/ismej.2014.156. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4276418/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4276418/pdf/emss-59698.pdf>
- Gullicks, H., Hasan, H., Das, D., Moretti, C., & Hung, Y.-T. (2011). Biofilm Fixed Film Systems. *Water*, 3(3), 843. Repéré à <http://www.mdpi.com/2073-4441/3/3/843>

- Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., Saylor, G. S. (2003). Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science & Technology*, 37(2), 343-351. doi: 10.1021/es0257164. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1021/es0257164>
- Hasnain, G., Khan, S. J., Arshad, M. Z., & Abdullah, H. Y. (2017). *Combined impact of quorum quenching and backwashing on biofouling control in a semi-pilot scale MBR treating real wastewater* (Vol. 39).
- He, Q., Zhu, Y., Fan, L., Ai, H., Huangfu, X., & Chen, M. (2017). Effects of C/N ratio on nitrous oxide production from nitrification in a laboratory-scale biological aerated filter reactor. *Water Science and Technology*, 75(6), 1270-1280. doi: 10.2166/wst.2016.447.
Repéré à <http://wst.iwaponline.com/content/ppiwawst/75/6/1270.full.pdf>
- Henze, M. (2000). *Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3* (Vol. 9). IWA publishing.
- Hermanowicz, S. W. (1999). Two-dimensional simulations of biofilm development: effects of external environmental conditions. *Water Science and Technology*, 39(7), 107-114. Repéré à <http://wst.iwaponline.com/content/ppiwawst/39/7/107.full.pdf>
- Holloway, R., Zhao, H., Rinne, T., Thesing, G., Parker, J., & Beals, M. (2008). The Impact of Temperature and Loading on Meeting Stringent Nitrogen Requirements in a Two-Stage BAF – A Comparison of Pilot and Full-Scale Performance. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2008(13), 3586-3601. doi: 10.2175/193864708788733189.
Repéré à <http://www.ingentaconnect.com/content/wef/wefproc/2008/00002008/00000013/art00044>
- Jefferson, K. K. (2004). *What drives bacteria to produce a biofilm?* (Vol. 236). doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x.
Repéré à <http://femsle.oxfordjournals.org/femsle/236/2/163.full.pdf>
<http://femsle.oxfordjournals.org/content/femsle/236/2/163.full.pdf>
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., & Wagner, M. (1998). Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira-Like Bacteria as Dominant Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3042-3051.
Repéré à <http://aem.asm.org/content/64/8/3042.abstract>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106813/pdf/am003042.pdf>

- Kim, J.-O., Cho, K. H., Ligaray, M., Jang, H. M., Kang, S., & Kim, Y. M. (2015). Monitoring influential environmental conditions affecting communities of denitrifying and nitrifying bacteria in a combined anoxic–oxic activated sludge system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 100, 1-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.01.016>.
Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830515000281>
- Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(3), 716-721. doi: [doi:10.1099/ijs.0.038075-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0). Repéré à <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.038075-0>
- Kindaichi, T., Kawano, Y., Ito, T., Satoh, H., & Okabe, S. (2006). Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(6), 1111-1121. doi: [10.1002/bit.20926](https://doi.org/10.1002/bit.20926). Repéré à <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20926>
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.20926/abstract>
- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., & Schmidt, T. M. (2001). rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 181-184. doi: [10.1093/nar/29.1.181](https://doi.org/10.1093/nar/29.1.181).
Repéré à <http://nar.oxfordjournals.org/content/29/1/181.abstract>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC29826/pdf/GKE063.pdf>
- Koch, H., Lücker, S., Albertsen, M., Kitzinger, K., Herbold, C., Spieck, E., Daims, H. (2015). Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus Nitrospira. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11371-11376. doi: [10.1073/pnas.1506533112](https://doi.org/10.1073/pnas.1506533112).
Repéré à <http://www.pnas.org/content/112/36/11371.abstract>
<http://www.pnas.org/content/112/36/11371.full.pdf>
- Koops, H.-P., Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Timmermann, G., & Wagner, M. (2006). The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria. Dans M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt (Éds.), *The Prokaryotes* (pp. 778-811). Springer New York. doi: [10.1007/0-387-30745-1_36](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_36). Repéré à http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30745-1_36
http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F0-387-30745-1_36
- Lavergne, C. (2014). *Role (structure and function) of nitrogen-related prokaryotic communities in an intertidal mudflat of the Marennes-Oleron bay: multi-scale influence of biotic and abiotic drivers* (Université de La Rochelle).
Repéré à CnrsSdeGip-beUniv-rochelle.
Repéré à <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01175468>

- Lawrence, J. R., & Neu, T. R. (1999). [9] Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. Dans *Methods in Enzymology* (Vol. 310, pp. 131-144). Academic Press. doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)10011-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)10011-9).
Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687999100119>
- Lazarova, V., & Manem, J. (1995). Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*, 29(10), 2227-2245. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00054-O](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(95)00054-O).
Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004313549500054O>
- Lee, Y. W., Chung, J., Jeong, Y. D., Shim, H., & Kim, M. H. (2006). Backwash Based Methodology for the Estimation of Solids Retention Time in Biological Aerated Filter. *Environmental Technology*, 27(7), 777-787. doi: 10.1080/09593332708618692. Repéré à <https://doi.org/10.1080/09593332708618692>
- Li, B., Qiu, Y., Zhang, C., Chen, L., & Shi, H. (2016). Understanding biofilm diffusion profiles and microbial activities to optimize integrated fixed-film activated sludge process. *Chemical Engineering Journal*, 302, 269-277. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.05.048>.
Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894716306714>
- Li, J., & Bishop, P. L. (2004). Time course observations of nitrifying biofilm development using microelectrodes. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 3(6), 523-528. doi: 10.1139/s04-027.
Repéré à <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/s04-027>
- Li, J., Nedwell, D. B., Beddow, J., Dumbrell, A. J., McKew, B. A., Thorpe, E. L., & Whitby, C. (2015). amoA Gene Abundances and Nitrification Potential Rates Suggest that Benthic Ammonia-Oxidizing Bacteria and Not Archaea Dominate N Cycling in the Colne Estuary, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 159-165. doi: 10.1128/aem.02654-14.
Repéré à <http://aem.asm.org/content/81/1/159.abstract>
- Li, Q., Lau, A., Morris, T. J., Guo, L., Fordyce, C. B., & Stanley, E. F. (2004). A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci*, 24(16), 4070-4081. doi: 10.1523/jneurosci.0346-04.2004.
Repéré à <http://www.jneurosci.org/content/24/16/4070.full.pdf>
- Liu, Y., Liu, H., Cui, L., & Zhang, K. (2012). The ratio of food-to-microorganism (F/M) on membrane fouling of anaerobic membrane bioreactors treating low-strength wastewater. *Desalination*, 297, 97-103.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2012.04.026>.
Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916412002470>

- Longo, S., d'Antoni, B. M., Bongards, M., Chaparro, A., Cronrath, A., Fatone, F., Hospido, A. (2016). Monitoring and diagnosis of energy consumption in wastewater treatment plants. A state of the art and proposals for improvement. *Applied Energy*, 179, 1251-1268. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.043>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261916309850>
- Lucker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., Daims, H. (2010). A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(30), 13479-13484. doi: 10.1073/pnas.1003860107
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., & Schleifer, K.-H. (1992). Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(4), 593-600. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80121-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80121-9). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202011801219>
- McTavish, H., Fuchs, J. A., & Hooper, A. B. (1993). Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*, 175(8), 2436-2444. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC204533/>
- Meincke, M., Bock, E., Kastrau, D., & Kroneck, P. H. (1992). Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*: redox centers and their catalytic role. *Archives of Microbiology*, 158(2), 127-131. doi: 10.1007/BF00245215. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/BF00245215> <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00245215>
- Mendoza-Espinosa, L., & Stephenson, T. O. M. (1999). A Review of Biological Aerated Filters (BAFs) for Wastewater Treatment. *Environmental Engineering Science*, 16(3), 201-216. doi: 10.1089/ees.1999.16.201. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1089/ees.1999.16.201> <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ees.1999.16.201>
- Meng, F., Shi, B., Yang, F., & Zhang, H. (2007). Effect of hydraulic retention time on membrane fouling and biomass characteristics in submerged membrane bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30(5), 359-367. doi: 10.1007/s00449-007-0132-1. Repéré à <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0132-1>
- Metcalf, E., & Eddy, M. (2014). Wastewater engineering: treatment and Resource recovery. *McGraw-Hill Education, New York*.
- Mohapatra, P. K. (2010). *Textbook of Environmental Biotechnology*. I.K. International Publishing House Pvt. Limited. Repéré à <https://books.google.ca/books?id=Q2ROFx0WtBQC>

- Monger, B. C., & Landry, M. R. (1993). Flow Cytometric Analysis of Marine Bacteria with Hoechst 33342. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 905-911. Repéré à <http://aem.asm.org/content/59/3/905.abstract>
- Morgenroth, E., & Wilderer, P. A. (2000). Influence of detachment mechanisms on competition in biofilms. *Water Research*, 34(2), 417-426. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00157-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00157-8). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135499001578>
- Morrison, T. B., Weis, J. J., & Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24(6), 954-958, 960, 962.
- Nelson, D. C., Jørgensen, B. B., & Revsbech, N. P. (1986). Growth Pattern and Yield of a Chemoautotrophic Beggiatoa sp. in Oxygen-Sulfide Microgradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(2), 225-233. Repéré à <http://aem.asm.org/content/52/2/225.abstract>
- Nogueira, R., & Melo, L. F. (2006). Competition between Nitrospira spp. and Nitrobacter spp. in nitrite-oxidizing bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(1), 169-175. doi: 10.1002/bit.21004. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1002/bit.21004> <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.21004/abstract>
- Nogueira, R., Melo, L. s. F., Purkhold, U., Wuertz, S., & Wagner, M. (2002). Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. *Water Research*, 36(2), 469-481. doi: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00229-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00229-9). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135401002299>
- Ohashi, A., Viraj de Silva, D. G., Mobarry, B., Manem, J. A., Stahl, D. A., & Rittmann, B. E. (1995). Influence of substrate C/N ratio on the structure of multi-species biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs. *Water Science and Technology*, 32(8), 75-84. doi: [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00010-8](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00010-8). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0273122396000108>
- Paffoni, C., Gousailles, M., Rogalla, F., & Gilles, P. (1990). Aerated Biofilters for Nitrification and Effluent Polishing. *Water Science and Technology*, 22(7-8), 181-189.
- Payraudeau, M., Paffoni, C., & Gousailles, M. (2000). Tertiary nitrification in an up flow biofilter on floating media: influence of temperature and COD load. *Water Science and Technology*, 41(4-5), 21-27.
- Pernthaler, J., Glöckner, F.-O., Schönhuber, W., & Amann, R. (2001). Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Dans *Methods in*

Microbiology (Vol. 30, pp. 207-226). Academic Press. doi: [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(01\)30046-6](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(01)30046-6).

Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0580951701300466>

Pester, M., Maixner, F., Berry, D., Rattei, T., Koch, H., Lucker, S., . . . Daims, H. (2014). NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing Nitrospira. *Environ Microbiol*, 16(10), 3055-3071. doi:10.1111/1462-2920.12300.

Repéré

à <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/14622920.12300/asset/emi12300.pdf?v=1&t=ie5sqlmy&s=e7b5d49e1f462eb2ddf74e2953e4ddb422ac3a53>

Pramanik, B. K., Fatihah, S., Shahrom, Z., & Ahmed, E. (2012). Biological aerated filters (BAFs) for carbon and nitrogen removal: a review. *Journal of engineering science and technology*, 7(4), 428-446.

Pujol, R., Lemmel, H., & Gousailles, M. (1998). A keypoint of nitrification in an upflow biofiltration reactor. *Water Science and Technology*, 38(3), 43-49. doi: [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00450-8](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00450-8).

Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273122398004508>

Règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées, Q-2, r. 34.1 C.F.R. (2014). Gouvernement du Québec.

Rice, E. W., Bridgewater, L., & Association, A. P. H. (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association Washington, DC.

Rocher, V., Paffoni, C., Goncalves, A., Azimi, S., Winant, S., Legaigneur, V., & Gousailles, M. (2007). La biofiltration des eaux usées : comparatif technique et économique de différentes configurations de traitement. *La Houille Blanche*, (1), 95-102. Repéré à <https://doi.org/10.1051/lhb:2007013>

Satin, M., & Selmi, B. (2006). *Guide technique de l'assainissement* (Le Moniteur éd.). Paris.

Satin Marc, S. B. (2006). *Guide technique de l'assainissement* (Le Moniteur éd.). Paris.

Sayavedra-Soto, L. A., Hommes, N. G., & Arp, D. J. (1994). Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in Nitrosomonas europaea. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 504-510. Repéré à <http://jb.asm.org/content/176/2/504.abstract> <http://jb.asm.org/content/176/2/504.full.pdf>

Schefe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., & Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C T difference" formula. *Journal of Molecular Medicine*, 84(11), 901-

910. doi: 10.1007/s00109-006-0097-6. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-006-0097-6>
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00109-006-0097-6>
- Schleper, C., Jurgens, G., & Jonuscheit, M. (2005). Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Microbiol*, 3(6), 479-488. doi: 10.1038/nrmicro1159
- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J. C., Ottengraf, S., & Amann, R. (1999). Microscale Distribution of Populations and Activities of Nitrosospira and Nitrospira spp. along a Macroscale Gradient in a Nitrifying Bioreactor: Quantification by In Situ Hybridization and the Use of Microsensors. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3690-3696.
 Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91552/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91552/pdf/am003690.pdf>
- Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M., & Amann, R. (1998). Identification and Activities In Situ of Nitrosospira and Nitrospira spp. as Dominant Populations in a Nitrifying Fluidized Bed Reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3480-3485.
 Repéré à <http://aem.asm.org/content/64/9/3480.abstract>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106750/pdf/am003480.pdf>
- Stahl, D. A., & Torre, J. R. d. l. (2012). Physiology and Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 83-101. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150128.
 Repéré à <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-micro-092611-150128>
- Stephenson, T., Cornel, P., & Rogalla, F. (2004). Biological Aerated Filters (BAF) in Europe: 21 Years of Full Scale Experience. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2004(10), 473-486. doi: 10.2175/193864704784131554. Repéré à <http://www.ingentaconnect.com/content/wef/wefproc/2004/00002004/00000010/art00039>
<http://dx.doi.org/10.2175/193864704784131554>
- Talleg, G., Garnier, J., & Gousailles, M. (2006). Nitrogen removal in a wastewater treatment plant through biofilters: nitrous oxide emissions during nitrification and denitrification. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29(5), 323-333. doi: 10.1007/s00449-006-0081-0. Repéré à <https://doi.org/10.1007/s00449-006-0081-0>
- Teske, A., Alm, E., Regan, J. M., Toze, S., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (1994). Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 176(21), 6623-6630.
 Repéré à <http://jb.asm.org/content/176/21/6623.abstract>
<http://jb.asm.org/content/176/21/6623.full.pdf>

- Thurnheer, T., Gmür, R., & Guggenheim, B. (2004). Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 37-47. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2003.09.003>.
Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016770120300246X>
- Torresi, E., Fowler, S. J., Polesel, F., Bester, K., Andersen, H. R., Smets, B. F., Christensson, M. (2016). Biofilm Thickness Influences Biodiversity in Nitrifying MBBRs—Implications on Micropollutant Removal. *Environmental Science & Technology*, 50(17), 9279-9288. doi: 10.1021/acs.est.6b02007.
Repéré à <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02007>
- Tschui, M., Boller, M., Gujer, W., Eugster, J., Mäder, C., & Stengel, C. (1994). Tertiary nitrification in aerated pilot biofilters. *Water Science and Technology*, 29(10-11), 53-60.
- van Loosdrecht, M., Dh, E., Gjaltema, A., Mulder, A., Tijhuis, L., & Heijnen, S. (1995). *Biofilm Structures* (Vol. 32). doi: 10.1016/0273-1223(96)00005-4
- Vanhooren, H. (2002). *Modelling for optimisation of biofilm wastewater treatment processes: a complexity compromise*.
- Vidal, A., Combeau, R., Costa, J., & Le Tallec, X. (1997). Biostyr Improvements: Control Process of the Aeration. *Annual Report of Anjou Research on Biostyr Process*.
- Vigne, E. (2007). *Etude et modelisation dynamique d'un procede par biofiltration en nitrification tertiaire* (Université Laval).
- Von Sperling, M. (2007). *Activated Sludge and Aerobic Biofilm Reactors*. London: IWA Publishing. Repéré à <http://www.oapen.org/record/640169>
- Wagner, M., Horn, M., & Daims, H. (2003). Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 302-309. doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00054-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00054-7). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527403000547>
- Watson, S. W., Bock, E., Valois, F. W., Waterbury, J. B., & Schlosser, U. (1986). *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Archives of Microbiology*, 144(1), 1-7. doi: 10.1007/bf00454947. Repéré à <https://doi.org/10.1007/BF00454947>
- WEF, & APHA. (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA*.
- Wei, D., Du, B., Xue, X., Dai, P., & Zhang, J. (2014). Analysis of factors affecting the performance of partial nitrification in a sequencing batch reactor. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*, 98(4), 1863-1870. doi: 10.1007/s00253-013-5135-z. Repéré à <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5135-z>
- Wen-Tso Liu, J. K. J. (2010). *Environmental Molecular Microbiology*. Horizon Scientific Press.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3741.
Repéré à <http://aem.asm.org/content/63/10/3741.full.pdf>
- Wimpenny, J., Manz, W., & Szewzyk, U. (2000). Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 661-671. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00565.x.
Repéré à <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00565.x>
- Winkler, M. K. H., Bassin, J. P., Kleerebezem, R., Sorokin, D. Y., & van Loosdrecht, M. C. M. (2012). Unravelling the reasons for disproportion in the ratio of AOB and NOB in aerobic granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(6), 1657-1666. doi: 10.1007/s00253-012-4126-9. Repéré à <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4126-9>
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359442/pdf/253_2012_Article_4126.pdf
- Yao, Q., & Peng, D.-C. (2017). Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. *AMB Express*, 7, 25. doi: 10.1186/s13568-017-0328-y.
Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5256632/>
- Zhao, H., Woods, C., Parker, J., & Hong, S.-N. (2006). Pilot Evaluation Of Floating Media Biological Aerated Filters (BAFs) To Achieve Stringent Effluent Nutrient Discharge Requirements. *Water Practice and Technology*, 1(4). doi: 10.2166/wpt.2006.071
- Zhou, H.-W., Li, D.-F., Tam, N. F.-Y., Jiang, X.-T., Zhang, H., Sheng, H.-F., Zou, F. (2010). BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity. *The Isme Journal*, 5, 741. doi: 10.1038/ismej.2010.160
<https://www.nature.com/articles/ismej2010160#supplementary-information>.
Repéré à <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2010.160>
- Zhu, S., & Chen, S. (2001). Effects of organic carbon on nitrification rate in fixed film biofilters. *Aquacultural Engineering*, 25(1), 1-11. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8609\(01\)00071-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8609(01)00071-1).
Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144860901000711>